ORSAY
Série A, N°
N° d'Ordre:

108

THÈSES

présentées

A LA FACULTÉ DES SCIENCES
DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

CENTRE D'ORSAY
pour obtenir
LE GRADE DE
DOCTEUR ES-SCIENCES NATURELLES

par

LUZZATI Mario

1ère THÈSE.— INHIBITION SPÉCIFIQUE DE LA RECOMBINAISON INTRAGÉNIQUE

2è THÈSE.— PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ

Soutenues le 22 Juin 1965 devant la Commission d'Examen

MM. RIZET — Président

MONOD
SLONIMSKI } Examinateurs

ORSAY
Série A, N°
N° d'Ordre:

108

THÈSES

présentées

A LA FACULTÉ DES SCIENCES
DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

CENTRE D'ORSAY
pour obtenir
LE GRADE DE
DOCTEUR ES-SCIENCES NATURELLES

par

LUZZATI Mario

1ère THÈSE._INHIBITION SPÉCIFIQUE DE LA RECOMBINAISON INTRAGÉNIQUE

2è THÈSE._PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ

Soutenues le 22 Juin 1965 devant la Commission d'Examen

MM. RIZET — Président

MONOD
SLONIMSKI } Examinateurs

UNIVERSITEITSBIBLIOTHEEK - LEIDEN -

FACULTE DES SCIENCES DE L'UNIVERSITE DE PARIS

PROFESSEURS

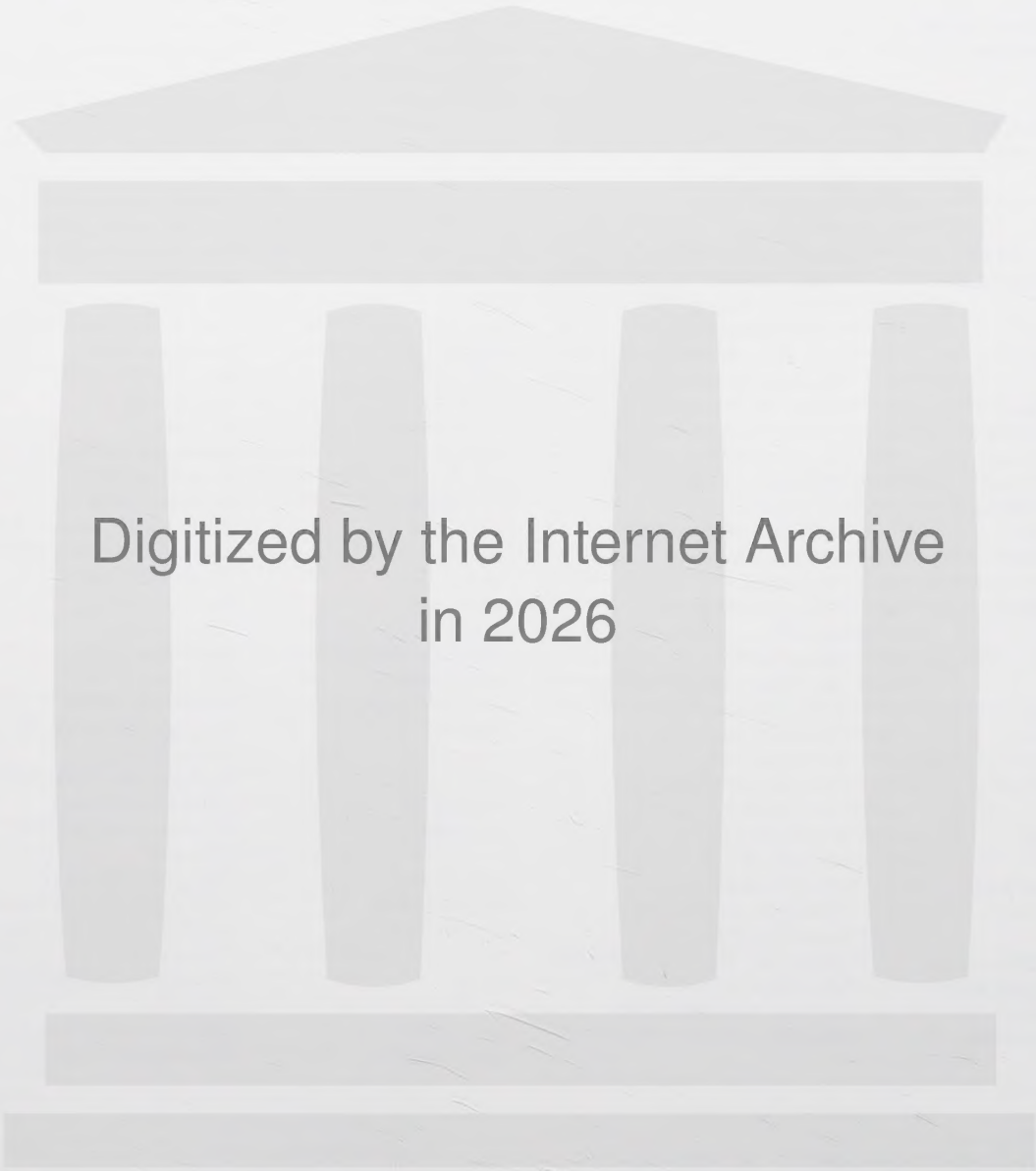
Doyen ..... M. ZAMANSKY

BRELOT	T	analyse supérieure
PRENANT	T	anatomie et histologie comparée
GRASSE	T	évolution des être organisés
PREVOST	T	chimie organique
WYART	T	minéralogie et cristallog.
TEISSIER	T	zoologie
MANGENOT	T	biologie végétale (Orsay)
AUGER	T	physique quantique & relativité
MONNIER	T	physiologie générale
PIVETEAU	T	paléontologie
ROCARD	T	physique (ENS)
CARTAN	T	mathématiques (ENS)
LAFFITTE	T	chimie générale
N ...	T	géométrie supérieure
COULOMB	T	physique du globe
Melle COUSIN	T	biologie animale SPCN
CHRETIEN	T	chimie minérale
BOCQUET	T	zoologie
KASTLER	T	physique ENS
EPHRUSSI	T	génétique
RIVIERE	T	géologie SPCN & sédimento. (Orsay)
GAUTHERET	T	biologie végétale PCB
LUCAS R.	T	recherches physiques
THOMAS A.	T	biologie cellulaire
ARNULF	T	optique appliquée
MORAND	T	physique enseignement
SOLEILLET	T	physique PCB
FORTIER	T	mécanique expérimentale des fluides
DRACH	T	zoologie
QUENEY	T	météorologie & dynamique atmosphérique
GALLIEN	T	embryologie
EICHHORN	T	botanique
DE CUGNAC	T	biologie végétale SPCN
Melle CAUCHOIS	T	chimie physique
THELLIER	T	physique du globe
L'HERITIER	T	biologie générale (Orsay)
GRIVET	T	radioélectricité (Orsay)
PONCIN	T	mécanique générale
DUBREIL	T	aritnm. & théorie des nombres
QUELET	T	chimie organique
CAGNIARD	T	géophysique appliquée
LENNUIER	T	physique MGP
RIZET	T	génétique (Orsay)
ROUTHIER	T	géologie appliquée
Mme TONNELAT	T	physique théorique
DIXMIER	T	mathématiques MPC
SOUCHAY	T	chimie générale
AIGRAIN	T	électrotechnique générale
BRUSSET	T	chimie systématique
CHAMPETIER	T	chimie macromoléculaire
CUVILLIER	T	micropaléontologie
JUNG	T	géologie
TRILLAT	T	microscopie et diffrac. électronique
WIEMANN	T	chimie organique et struc.
JACQUINOT	T	spectroscopie & physique céleste (Orsay)
VASSY	T	physique de l'atmosphère
DESTOUCHES	T	théorie physique
AMIEL	T	chimie générale
HOCART	T	minéralogie & cristallo.
MATHIEU JP.	T	physique optique
COUTEAUX	T	cytologie
MAY	T	zoologie
CHOQUET	T	théorie des fonctions et topologie
FELDMANN	T	biologie végétale marine
GUINIER	T	physique des solides (Orsay)
JOST	T	physiologie comparée
FORTET	T	calcul des probabilités & physique mathématique
SCHWARTZ	T	calcul dif. & intégral
CHOUARD	T	physiologie végétale
MALAVARD	T	aviation (techn. aéron.)
NORMANT	T	synthèse organique
BENARD	T	chimie minérale
BUVAT	T	botanique ENS
DUGUE	T	statistiques mathémat.
SOULAIRAC	T	psychophysiologie
ULRICH	T	physiologie végét. appl.
MARECHAL	T	optique théor. & appliq.
KIRRMANN	T	théories chimiques
CHADEFAUD	T	botanique
Melle LE BRETON	T	physiologie de la nutrit.
LELONG	T	application de l'analyse à la géométrie
DEVILLERS	T	anatomie & histologie comparée
EHRESMANN	T	topologie algébrique
FRANCON	T	physique SPCN
GLANGEAUD	T	géographie phys. & géologie dynamique
DODEMENT	T	mathématiques MGP
PISOT	T	techniques mathématiques de la physique
ROCH	T	géologie
SCHATZMANN	T	astrophysique
TERMIER	T	géologie générale
ZAMANSKY	T	mathématiques générales
LUCAS	T	géologie
ALLARD	T	chimie physique
BERTHELOT	T	physique des particules fondamentales (Orsay)
BRICARD	T	météorologie & physique de l'atmosphère (Orsay)

LEVY M.	T	physique théorique des hautes énergies (Orsay)
Mme CHAIX	T	chimie biologique
Mme HUREL PY	T	biologie végétale PCB
PANNETIER	T	chimie générale
BRUN	T	mécanique des fluides I
LEDERER	T	chimie biologique (Orsay)
Mme DUBREIL	T	mathématiques (agrégat.)
Mme LELONG	T	mathématiques II (ENS)
BELLAIR	T	géologie (SPCN)
COTTE	T	physique électricité
DUBOIS J.E.	T	chimie organique
LAMOTTE	T	zoologie (ENS)
MICHEL A.	T	chimie minérale (Orsay)
OLMER	T	énergétique générale
ROUAULT	T	électricité (Orsay)
GAUTHIER	T	mécanique appliquée
BARCHEWITZ	T	chimie physique
BROSSEL	T	physique atomique
BUSER	T	physiologie comparée
CAMUS	T	physiologie végétale
CASTAING	T	physique II thermodynamique (Orsay)
CURIEN	T	minéralogie & cristallog.
MOYSE	T	physiologie végétale (Orsay)
Mme CHARNIAUX COTTON	T	évolution des êtres organisés
POSSOMPES	T	zoologie
PULLMANN	T	chimie quantique
TEILLAC	T	physique nucléaire & radioactivité (Orsay)
TONNELAT	T	biologie-physico-chimique (Orsay)
VILLE	T	économétrie
WUILLEMART	T	chimie (PCB)
DODE	T	chimie (Orsay)
FREYMANN	T	recherches physiques
GUINOCHET	T	biologie végétale SPCN (Orsay)
ROLLET	T	chimie minérale
Melle JOSIEN	T	chimie SPCN
CHEVALLEY	T	géométrie algébrique & théorie des groupes
ARNOULT	T	électronique (Orsay)
CHAPELLE	T	physique I (Orsay)
DELANGE	T	mathématiques I (Orsay)
DENY	T	mathématiques gles
GERMAIN	T	mécanique théorique des fluides
LACOMBE	T	métallurgie des métaux nucléaires (Orsay)
BROCHARD	T	physique MGP (Orsay)
CABANNES	T	mécanique générale
LESIEUR	T	mathématiques I (Orsay)
MAZET	T	mécanique générale (Orsay)
CAIRE		géographie phys. & géol. dynamique
Mme ALBE FESSARD	T	psycho-physiologie
FRIEDEL	T	physique des solides (Orsay)
JULIA M.	T	études des moléculaires naturelles complexes
LENDER	T	biologie animale SPCN (Orsay)
MAGAT	T	physico-chimie des radio-éléments
Melle QUINTIN	T	électrochimie
MONOD	T	chimie du métabolisme
BENOIT	T	physio. animale (Orsay)
DE POSSEL	T	analyse numérique
CHARLOT	T	chimie analytique
LEMEE	T	écologie végétale (Orsay)
GUERIN	T	chimie MPC (Orsay)
CHATELET	T	chimie (PCB)
JEAN	T	physique nucléaire (Orsay)
MATTLER	T	physique (SPCN)
BERGERARD	T	zoologie (Orsay)
BERTEIN	T	électronique (Orsay)
BOUISSIERES	T	radiochimie
Mme COUTURE	T	thermodyn. & méca. phys.
ELLEMBERGER	T	géologie des grandes régions du globe (Orsay)
FRANC	T	biologie animale (PCB)
SCHNELL		botanique tropicale
STOLKOWSKI	T	physiologie végétale
ACHER	T	chimie biologique
BAUDOIN	T	biologie animale (PCB)
BEAUMONT		biologie animale SPCN
BLAMONT		géophysique ionosphère
BOUREAU	T	botanique
CURIE D.		physique (MGP)
DURAND DELGA	T	géologie
FREON	T	chimie organique (Orsay)
HELLER	T	physiologie végétale
TORTRAT	T	calcul des probabilités
CAILLEUX	T	géologie (SPCN)
MAGNAN		physique électricité
DAUDEL	T	mécanique ondulatoire appliquée à la chimie théorique & à la physique nucléaire
Melle FOURCROY		biologie végétale SPCN
Mme CHOQUET BRUHAT	T	mécanique analytique & mécanique céleste
Melle VEIL	T	physiologie générale
LWOFF	T	microbiologie
SIESTRUNCK	T	mécanique physique & expérimentale
NERON	T	mathématiques (MPC) (Orsay)
Mme PECKER-WIMEL	T	astrophysique
BALKANSKY		physique MPC
LE CORRE	T	électricité
DELCROIX	T	physique théorique (Orsay)
GOURDIN		physique théorique des hautes énergies (Orsay)
LEHMANN	T	physique expérimentale des hautes énergies

COMOLET		mécanique des fluides
CORABOEUF	T	physio animale (Orsay)
DELLOUE	T	physique de l'exosphère
GORENFLOT		botanique II (Orsay)
HOUILLON		biologie animale PCB
JULLIEN J.		chimie SPCN (Orsay)
MALGRANGE	T	techniques math. de la phys. (Orsay)
OLIVIER		anthropologie
NOZERAN	T	botanique II (ORSAY)
BLANC LAPIERRE	T	physique ENS (Orsay)
CHEVAUGEON	T	botanique (Orsay)
KAHANE	T	mathématiques (Orsay)
SAMUEL	T	math. ENS féminines
KOURGANOFF	T	astronomie (Orsay)
THIRY	T	mécanique céleste
ABELES		physique SPCN
AMAT	T	physique PCB
AUBOIN	T	géologie
Mme BENOIST GUEUTAL	T	physique nucléaire & radio-activité (Orsay)
BOUGIS		biologie marine Villefranche s/Mer
BRUHAT	T	mathématiques MPC
BRUNN	T	géologie historique (Orsay)
CHABBAL	T	physique MGP (Orsay)
DEHEUVELS	T	mathématiques propéd.
D'ESPAGNAT	T	physique théor. (Orsay)
FURON	T	géologie SPCN
Mme GANS	T	génétique
GENEVES		biologie végétale PCB
GUILBERT		physique CSU Orléans
HUPE	T	pétrographie
HOLLANDE	T	biologie générale
LIONS	T	analyse numérique
MAITTE	T	chimie PCB
MEYER		physique propédeutique
NICOLAS		géologie appliquée
PANIGEL		biologie générale
RAVIER		pétrographie
ROSEAU	T	mécanique théorique des fluides
ROUBINE		électronique
SILBER	T	chimie PCB
UEBERSFELD	T	électronique
YVON	T	théories physiques
HERVE	T	mathémathiques
JANCOVICI		physique atomique (Orsay)
FALK-VAIRANT		physique nucléaire
FETIZON		chimie propédeutique
CERF		mathématiques (Orsay)
NATAF	T	physique nucléaire & radio-activité (Orsay)
ECHALIER		biologie animale PCB
BARRAUD		physiologie cellulaire
LIORET	P	physiologie végétale (Orsay)
DARS		géologie structurale & géologie appliquée
CAMEFORT	T	botanique (agrégation)
VICHNIEWSKY	T	mécanique industrielle
BLAQUIERE		électronique (Orsay)
ARNOUS	T	physique théorique
TATIBOUET		chimie (CSU Orléans)
MALLIAVIN	T	mathématiques propé-deutiques (Orsay)
GAUDEMAR		chimie propédeutique
PEREZ Y JORBA		physique expérimentale des hautes énergies (Orsay)
DAVID	T	chimie (agrégation Orsay)
BROUSSE	T	mécanique théorique
ROSCH	T	astronomie
GUY	T	physique expérimentale
LAZARD		mathématiques MPC
MOREL Pierre		physique MPC
ARSAC		programmation
LEFEBVRE		chimie MPC
CHAPEVILLE		biochimie
BENOIT		physique CPEM
RIO		chimie CPEM
JAUZEIN		géologie ENS
PREVOST G.		biologie végétale CPEM
FAVARD P.		biologie animale CPEM
VILKAS		chimie CPEM
Melle FICINI		chimie CPEM
LEQUEUX		astronomie
COHEN TANNOUDJI		physique MPC
TAVERNIER		physique CPEM
Mme ROIZEN		physique CPEM
DURAND M.		biologie animale SPCN
PASCAUD		physiologie
Mme PETIT		biologie animale CPEM
BROUSSE		géologie (Orsay)
CAGNAS		physique agrégation (Orsay)
LE BERRE		zoologie (Orsay)
SCHAEFFER		microbiologie (Orsay)
de GENNES		physique des solides (Orsay)
RIOU		physique nucléaire expé. (Orsay)
CLAUSER		chimie biologique (Orsay)
CHEVALIER		physiologie animale (Orsay)

Le SECRETAIRE GENERAL : R. POULLAIN .


Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41534910_0012

AVANT - PROPOS

Le travail qui va être présenté a été réalisé au Laboratoire de Génétique Physiologique du C N R S , à Gif - sur - Yvette.

Je tiens à remercier Mr le Professeur B. EPHRUSSI de m'avoir accueilli dans son laboratoire et d'avoir encouragé mes recherches tout au long de leur réalisation.

J'exprime ma reconnaissance à Mr le Professeur G. RIZET, pour ses suggestions et ses conseils utiles, ainsi qu'à Mr le Professeur J. MONOD, qui a bien voulu accepter de juger ce travail.

Que Mr le Professeur P. SLONIMSKI, qui a bien voulu me confier l'étude d'un phénomène qu'il avait observé, et qui a dirigé ce travail depuis le début, veuille trouver ici l'expression de ma plus profonde gratitude. Maître et ami, ses idées et ses conseils m'ont aidé à surmonter les difficultés rencontrées au cours de ce travail et ont permis de le mener à bonne fin.

Il m'est agréable de souligner que ce mémoire est le fruit d'un travail en équipe. L'étroite collaboration avec Mme L. CLAVILIER au début de ces recherches a suscité de nombreuses et fructueuses discussions. Je voudrais lui exprimer ici ma sincère gratitude . Je tiens à remercier Mr T. KLOPOTOWSKI de m'avoir permis de présenter des résultats non publiés, obtenus en collaboration avec lui, ainsi que Melle G. PERE pour sa participation enthousiaste et efficace à une partie de ce travail.

J'exprime également ma gratitude à tous ceux qui, par leurs précieux conseils et par l'intérêt porté à cette étude, ont contribué à sa rédaction : en particulier, Melle E. NEWMAN, Mr J. GUERDOUX et Mr G. PREVOST. J'adresse aussi mes remerciements à Mme G. BOISSONNET et à Mlle M. CHANCEREL qui ont collaboré à la réalisation matérielle de ce mémoire.

La collaboration technique de Mme I. LAPORTE, sa compétence et son dévouement, ont été particulièrement précieux à l'aboutissement de ces recherches : je tiens à la remercier ainsi que Mlle M. MITTELETTE, pour son assistance technique pendant la dernière partie du travail.

Enfin, j'exprime ma reconnaissance à l'ensemble du personnel du Laboratoire de Génétique Physiologique, pour la sympathie qu'il m'a toujours témoignée et pour l'atmosphère de camaraderie dans laquelle ce travail a pu être réalisé .

... Otro más sabio podrá
Encontrar razon mejor
Yo no soy rebuscador
Y ésta me sirve de luz ...

JOSE HERNANDEZ :

" MARTIN FIERRO "

INTRODUCTION

Le métabolisme d'une cellule est réglé à chaque instant avec une précision remarquable. Le moyen le plus économique pour la cellule d'assurer la régulation des processus anaboliques est d'agir sur la synthèse des acides aminés, bases nucléiques, etc... produits finaux des chaînes de biosynthèse. Cette régulation confèrera un avantage sélectif à la cellule, si elle est inscrite dans le patrimoine héréditaire.

Les mécanismes de régulation ont fait l'objet d'études approfondies au cours des quinze dernières années. On a montré qu'il y avait régulation, soit de l'activité, soit de la synthèse des enzymes.

Régulation de l'activité des enzymes .

Le produit final d'une chaîne biosynthétique inhibe l'activité d'un enzyme de la chaîne. Cette action ou rétroinhibition est extrêmement efficace, car un léger excès du produit final qu'il soit fourni à la cellule ou synthétisé par elle, suffit pour arrêter complètement la synthèse (GORINI, 1958). Ce phénomène de rétroinhibition est général (voir UMBARGER, 1961) et il a été mis en évidence dans plusieurs chaînes biosynthétiques concernant aussi bien les acides aminés que les bases puriques et pyrimidiques. L'enzyme sur lequel le contrôle s'exerce est une protéine dite allostérique (MONOD et JACOB, 1961). Sa structure, comme celle de toute protéine, étant gouvernée par un gène, la rétroinhibition se trouve ainsi inscrite dans le génome.

Régulation de la biosynthèse des enzymes.

Dans une chaîne biosynthétique le produit final inhibe aussi la production des enzymes nécessaires à sa propre biosynthèse. Ce mécanisme, appelé répression, est très important pour l'économie de la cellule : il épargne la synthèse d'enzymes qui ne sont plus nécessaires par suite de l'arrêt du débit de la chaîne biosynthétique par rétroinhibition.

Par ailleurs, la biosynthèse des enzymes peut être augmentée en présence de leur substrat. Ce mécanisme de régulation est appelé induction (voir MONOD et COHN, 1952). Par opposition à la répression que l'on pourrait qualifier de négative, l'induction est positive, puisque la cellule ne synthétise un enzyme qu'en présence du substrat correspondant. Ces deux derniers mécanismes peuvent s'expliquer en réalité par un schéma unique (JACOB et MONOD, 1961b).

Inhibition de la recombinaison du gène.

Les deux derniers mécanismes de régulation (répression et induction) agissent sur l'expression du gène, c'est-à-dire sur sa fonction hétérocatalytique. Jusqu'à ces dernières années on ne soupçonnait pas que des mécanismes semblables pouvaient exister pour gouverner des évènements strictement génétiques tels que la recombinaison ou la mutation. En d'autres termes, on pouvait difficilement imaginer une régulation de la fonction autocatalytique des gènes lorsque celle-ci conduit à la création d'une nouvelle information génétique. Cependant nous avons mis en évidence (LUZZATI, CLAVILIER et SLONIMSKI, 1959 ; CLAVILIER, LUZZATI et SLONIMSKI, 1960) un phénomène qui peut s'interpréter de cette façon. Chez la levure Saccharomyces cerevisiae, les mutations ad3 se traduisent par l'apparition des besoins simultanés en adénine et en histidine. La recombinaison intragénique chez une souche diploïde hétéroallélique ad3-a/ad3-b, décelée par l'apparition de colonies prototrophes à partir d'une population de cellules auxotrophes, est inhibée spécifiquement par l'histidine.

Cette observation originale méritait une étude approfondie.

Il était tout d'abord indispensable d'éliminer des explications banales fondées sur des mécanismes de sélection ; ensuite, il fallait montrer la spécificité chimique et génétique du phénomène, étudier ses paramètres et démontrer que l'histidine agissait sur l'évènement génétique lui-même. Ceci a pu être fait grâce à une technique que nous avons mise au point, qui permet l'étude du phénomène en milieu liquide. Nous avons dû utiliser un tel milieu pour surmonter les nombreuses difficultés inhérentes à l'utilisation des milieux gélosés pour ce genre d'études. Le phénomène étudié étant entièrement nouveau, nous avons réalisé un effort particulier pour démontrer, sans ambiguïté possible, que c'est effectivement la recombinaison intragénique du gène ad3 qui est inhibée par l'histidine.

L'ensemble de cette étude fera l'objet du deuxième chapître du présent mémoire.

L'évènement génétique étudié est une recombinaison mitotique non-réciproque entre deux allèles. Il s'agit d'un cas de conversion génique (voir ROMAN, 1963.). CLAVILIER, (1962), a montré que la reversion chez une souche diploïde hétéroallélique pour le locus ad3, correspond bien à une recombinaison non-réciproque. Ceci a confirmé ce que ROMAN (1956a) avait trouvé pour le même locus ainsi que pour d'autres loci gouvernant la synthèse de l'adénine chez la levure. Nous utiliserons dorénavant le terme conversion génique pour désigner cette recombinaison intragénique.

Le troisième chapître de ce mémoire sera consacré à l'étude d'un type particulier de gènes suppresseurs du locus ad3. Ils ne suppriment que le besoin en histidine des

mutants ad3 ; certains siègent à l'intérieur du locus, d'autres à l'extérieur. Fait remarquable, la présence de ces derniers inhibe aussi la conversion génique au locus ad3 . Cette inhibition de la recombinaison intragénique par d'autres gènes, constitue un cas nouveau et intéressant. Au cours de la discussion de ce même chapître, nous proposerons une hypothèse pour expliquer cette inhibition.

Par la suite, de façon à préciser le mode d'action de l'histidine sur la conversion génique, nous avons été amenés à étudier quelques étapes de la chaîne de biosynthèse de l'histidine chez la levure : elle ne semble pas différente de celle des bactéries. Cette étude, couplée avec l'étude de la répression par l'histidine de quelques enzymes de la même chaîne, fera l'objet du quatrième chapître du présent mémoire.

Enfin, lors de la discussion générale, nous proposerons une hypothèse concernant le mécanisme de l'inhibition par l'histidine de la recombinaison intragénique au locus ad3. Nous suggèrerons d'autre part des expériences qui pourraient montrer que l'inhibition spécifique de la recombinaison n'est pas particulière à ce gène.

CHAPITRE I

MATERIEL, DEFINITIONS & TECHNIQUES

I - INTRODUCTION

Le matériel qui a été utilisé dans le présent mémoire est une levure : Saccharomyces cerevisiae . Nous désignerons dorénavant cette espèce par le mot "levure".

Le cycle biologique de cet organisme (figure 1) comporte deux phases,

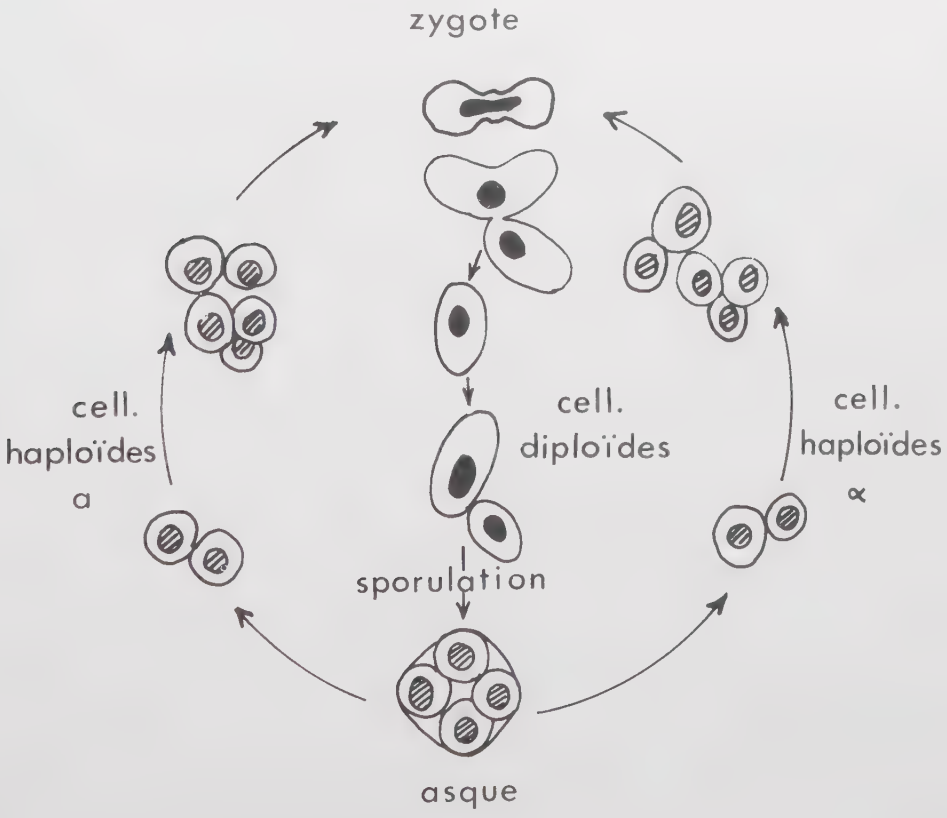


FIGURE 1

Cycle biologique de la levure Saccaromyces cerevisiae

haploïde et diploïde, qui peuvent se maintenir chacune indéfiniment par multiplication végétative. Celle-ci se fait par bourgeonnement : l'accroissement du nombre de cellules suit une loi logarithmique comme chez les bactéries. On peut aisément passer d'une phase à l'autre. Si l'on induit la méiose chez une culture d'une souche diploïde on obtient, au bout de quelques jours, la formation d'asques contenant quatre spores. Ces quatre spores correspondent aux quatre produits de la méiose. Chaque spore, après germination, donnera naissance à une souche haploïde. L'analyse du phénotype de chacune de ces quatre souches constitue ce qu'on appelle une analyse de tétrades. Ainsi on a vu que le signe est contrôlé par un seul couple d'allèles a/α . Si l'on met en présence deux clônes issus l'un d'une spore a et l'autre d'une spore α , on peut observer sous le microscope la formation d'un zygote, qui donnera naissance à une souche diploïde.

II - NOMENCLATURE

Nous désignons les souches diploïdes, qui ont toutes été obtenues au Laboratoire, par deux lettres LM suivies d'un numéro arbitraire. Ces souches ont été obtenues par croisement de souches haploïdes, soit en provenance d'autres laboratoires, soit obtenues par nous par sporulation de souches diploïdes . Dans ce dernier cas la nomenclature utilisée nous permet de remonter à son origine. Le premier numéro indique la souche diploïde dont elle est issue, le deuxième, la spore. Si ce deuxième numéro est suivi d'une des quatre premières lettres de l'alphabet, cela indique une spore issue d'une tétrade. Autrement, la spore est issue d'une sporulation en masse.

Les génotypes sont désignés suivant la nomenclature adoptée au colloque de Carbondale (U.S.A.) (Von BORSTEL, 1963) : deux lettres minuscules pour les déficiences biochimiques, les mêmes lettres majuscules pour l'allèle sauvage. Le chiffre qui suit, indique des allèles différents, tandis que le sous-chiffre indique des hétéroallèles (voir définitions) : s indique un suppresseur récessif; S, un suppresseur dominant.

III - MATERIEL

A. Souches haploïdes provenant d'autres laboratoires .

Numéro	Origine	Génotype
I258-5A	H. JAKOB	a me_1
4021 D	H. ROMAN	a ad3-6 tr_1 me_1 ad2 hi_1
6153 C	"	α ad3-3 ur_1 ad6
4017 C	"	a ad3-3 tr_1
DJ 3	R.K. MORTIMER	α SU_1 ma g2 me_1 th2-3
GA 6	"	α SU_1 ma g2 me_1 th2-4
JD 101	"	a th3-1 ad2
JD 127	"	a th3-3 ad2
JD 141	"	a th6-2 ad2
JB 100	"	α th6-1 ad2
S 395 D	"	a hi_1 le_1 tr_2
S 732 C	"	a hi_2 ga_1 tr_1 ad_1
S 827 A	"	a hi_5 tr_1 ad_1
X 901-35A	"	a hi6 th2 ty4 tr5 le_1 ad6 ur_1 ar4-I th_1 cu_1
S 878 C	"	a hi7 le_1
S 1237 B	"	a hi8 ur_1 ly2
3-13	"	a hi9
D 273-10B	F. SHERMAN	α ma

B - Souches haploïdes isolées au laboratoire :

Numéro	Origine	Génotype
4021 D-3	sub-clone monocolonial de 4021 D	
6153 C-9	" "	6153 C
02-7	LM 2	a ad3-3 ur_1
02-7 r9	02-7	a ad3-3 S9-hi ur_1
02-7 r14	"	a ad3-3 s14-hi ur_1
02-7 r15	"	a ad3-3 s15-hi ur_1
02-7 r17	"	a ad3-3 s17-hi ur_1
02-7 r21	"	a ad3-3 s21-hi ur_1
	spore provenant d'une réversion de	
04-4	LM 27	α ad3-20 S_{hi} ur_1
04-9g	"	α ad3-20 S_{hi} ur_1
18-10	LM 18	α tr_1 me_1
18-27	"	α ad3-6 tr_1 me_1
22-13	LM 22	a th2-3 ur_1
23-22	LM 23	α ad3-3 th2-4
27-1	LM 27	α ad3-6 tr_1 ur_1
39-2C	LM 39	α me_1 ur_1
39-6D	"	α ad3-6 th2-3 tr_1
55R9-3C	LM 55-R9	a ad3-6 ur_1
83-4D	LM 83	α ad3-6 s15-hi th2-3
94-3B	LM 94	a ad3-3 s14-hi me_1 tr_1 ur_1
94-4C	"	α ad3-3 s14-hi
95-3A	LM 95	α ad-3 s17-hi me_1
95-4D	"	a ad3-3 s17-hi me_1 ur_1
96-2B	LM 96	a ad3-3 s21-hi me_1 tr_1
96-2C	"	α ad3-3 s21-hi me_1
111-2A	LM 111	α th3-1 ad2 ad3-6
113-2A	LM 113	a th3-3 ur_1
191-4A	LM 191	a hi_1
192-4B	LM 192	a hi_2
195-4C	LM 195	α hi5
196-2	LM 196	a hi6
197-4D	LM 197	α hi7
198-4D	LM 198	α hi8
199-2C	LM 199	α hi9
265-9B	LM 265	α ad3-6 tr_1 ur_1

C - Souches diploïdes .

Numéros	Origine		
LM 2	réversion de		LM 27
LM 18	27-I	x	1258-5A
LM 22	02-7	x	DJ 3
LM 23	02-7	x	GA 6
LM 27	4021D-3	x	6153C-9
LM 39	22-13	x	18-27
LM 55	02-7	x	27-1
LM 55-R9	réversion de		LM 55
LM 56	02-7	x	23-22
LM 57	04-4	x	4021-D3
LM 58	04-4	x	4017C
LM 59	39-6D	x	02-7
LM 80	39-6D	x	02-7 r9
LM 83	39-6D	x	02-7 r15
LM 94	39-2C	x	02-7 r14
LM 95	39-2C	x	02-7 r17
LM 96	39-2C	x	02-7 r21
LM 111	JD 101	x	265-9B
LM 113	JD 127	x	265-9B
LM 125	111-2A	x	113-2A
LM 131	JD 141	x	JB 100
LM 145	02-7	x	83-4D
LM 146	02-7 r15	x	83-4D
LM 191	D273-10B	x	S395 D
LM 192	"	x	S732 C
LM 195	"	x	S827 A
LM 196	"	x	X901-35 A
LM 197	"	x	S878 C
LM 198	"	x	S1237 B
LM 199	"	x	3-13
LM 264	02-7	x	18-10
LM 265	18-10	x	55R9-3C

IV - COMPOSITION DES MILIEUX DE CULTURE

A - Milieux naturels :

YPG = Yeast extract Difco, 10 g ; bacto-peptone Difco, 10 g ; glucose, 20 g ; eau distillée qsp 1 litre

YPGA = Milieu précédent additionné de 20 mg d'adénine par litre.

YPGly = YPG avec remplacement du glucose par du glycérol.

YPD = Milieu précédent additionné de 1 g. de glucose par litre.

B - Milieux synthétiques :

GO = Milieu minimal : = $NH_4H_2PO_4$, 6 g ; $MgSO_4$, 0,5 g ; $(NH_4)_2SO_4$, 2 g ; KH_2PO_4, 1 g ; NaCl, 0,1 g ; $CaCl_2$ anhydre, 0,1 g ; $FeCl_3$, 0,0002 g ; H_3BO_3, 0,0005 g ; $CuSO_4$, 0,00004 g ; KI, 0,0001 g ; $MnSO_4$, 0,0004 g ; Na_2MoO_4, 0,0002 g ; $ZnSO_4$, 0,0004 g ; pantothénate de calcium, 0,002 g ; meso Inositol, 0,002 g ; pyridoxine, 0,002 g ; acide nicotinique, 0,0005 g ; biotine, 0,00002 g ; glucose, $1H_20$, 20 g ; eau distillée qsp 1 litre.

Ce milieu de base (GALZY et SLONIMSKI, 1957) est enrichi en meso inositol à raison de 0,02 g par litre; suivant les nécessités on ajoute au milieu de base différents facteurs de croissance :

Adénine, 20 mg/l ; uracile, 20 mg/l ; DL méthionine, 20 mg/l ; Dl tryptophane, 40 mg/l ; DL thréonine, 500 mg/l ; L histidine 10 mg/l .

Chacun de ces milieux a sa propre nomenclature. Nous consignerons ici les milieux les plus souvent utilisés :

G 7 GO plus adénine

G 16 " " histidine

G 8 " " adénine plus histidine .

Les mêmes milieux précédés de la lettre D (différentiel) indiquent un changement de la source de carbone. Le glucose à 2 % a été remplacé par glycérol à 2 % plus glucose 0,1 % .

C - Milieu de présporulation :

Yeast extract, 0,5 % ; glucose, $1H_20$: 2 % ; $(NH_4)_2SO_4$, 0,2 % ; KH_2PO_4 : 0,2. (Mc CLARY, NULTY et MILLER, 1959) .

D - Milieu de sporulation :

Yeast extract : 0,25 % ; glucose, $1H_2O$: 0,1 % ; acetate de potassium anhydre 0 1 M. (Mc CLARY, NULTY et MILLER, 1959).

V - DEFINITIONS

Nous adopterons la terminologie de ROMAN (1956b).

1) Un diploïde sera appelé hétéroallélique pour un locus donné, quand il provient du croisement de deux souches haploïdes présentant la même déficience biochimique, ne se complémentant pas, mais correspondant à des mutations à des sites différents . Le diploïde sera appelé homoallélique quand les deux mutations sont au même site.

On peut distinguer ces deux catégories de diploïdes par leur fréquence de réversion vers la phototropnie pendant leur croissance végétative quand il s'agit de déficiences biochimiques. Un diploïde hétéroallélique reverse avec une fréquence de 10^{-4}-10^{-5}, la fréquence de réversion d'un diploide homoallélique, étant 100 - 1000 fois plus faible.

2) Après étalement sur milieu gélosé, on appelera :

Colonie : tout clône visible à l'oeil nu ou sous une loupe d'un compteur de colonies Montagné (agrandissement 2 x). Chaque colonie contient de 150 000 cellules à quelques millions de colonies.

Microcolonies : tout clône visible sous le microscope (agrandissement 100 x) ne contenant pas plus de 500 cellules.

Cette notion de microcolonie est utilisée pour déterminer la croissance résiduelle car toute culture qui se divise même lentement donnera à plus ou moins longue échéance une colonie visible.

Centre formateur de colonies (cfc): toute cellule ou groupe de cellules qui donnera naissance après incubation à une colonie visible.

Le nombre de cfc peut être inférieur au nombre de cellules étalées pour deux raisons principales, d'une part par défaut d'étalement, deux cellules se trouvant trop près l'une de l'autre ne donnent naissance qu'à une seule colonie, et d'autre part aux caractéristiques des souches. Par exemple les souches haploïdes poussent en amas et leur dissociation par étalement n'est pas facile. Chez les souches diploïdes, le rapport entre le nombre de cfc et le nombre de cellules étalées est voisin de 1.

Souche prototrophe "établie" : issue directement d'une souche auxotrophe, et ayant effectué de nombreuses générations cellulaires depuis sa formation. On ne préjuge en rien de la nature de l'évènement génétique qui est à l'origine du passage de l'auxotrophie à la prototrophie, conversion génique ou mutation reverse, par exemple.

VI - TECHNIQUES

Nous décrirons toutes les techniques courantes employées au laboratoire et auxquelles nous n'avons pas (ou peu) apporté de modifications. Les techniques spéciales à un certain type de travail expérimental seront décrites plus tard.

A - Stérilisation .

Les milieux sont stérilisés à l'autoclave à 120°C pendant 20 minutes. Tous les milieux peuvent être solidifiés par addition de Bacto-agar Difco à raison de 20 g/l. Ces milieux gélosés stériles sont répartis à chaud dans des boîtes de Pétri, préalablement stérilisées au four Pasteur à 160°C pendant quatre heures. Ce procédé est également utilisé pour toute la verrerie stérile.

B - Collections .

Les souches sont conservées dans de petits tubes vissés contenant 3 ml d'YPGA gélosé. Après l'ensemencement et une culture de 48 heures à 28°C, les tubes sont conservés à la chambre froide. On effectue un repiquage tous les 10 mois environ.

C - Modes de culture .

1. Cultures liquides . Les cultures liquides sont faites soit en tubes à essai contenant 5 ml de milieu, soit en erlenmeyers contenant 1/10 de leur volume de milieu. On place le tube à essai avec un angle d'inclinaison de 60° ou l'erlenmeyer sur le plateau d'un appareil à secouer dans une étuve à 28°C. Quand le milieu contient de l'acriflavine, il est indispensable de le protéger de la lumière en enveloppant chaque tube dans du papier aluminium.

2. Cultures sur milieux solides. On dépose 0,1 - 0,2 ml d'une suspension cellulaire de dilution adéquate sur une boîte de Pétri et on étale à l'aide d'un étaleur de verre. Chaque cfc donne naissance à une colonie visible au bout de 2 jours. Les isolements monocoloniaux sont faits souvent par strie à l'aide d'une anse en platine. Lorsqu'on réalise des comptages du nombre de colonies, on étale 5 boîtes de Pétri à raison d'une centaine de colonies par boite.

D - Mesures de la croissance .

La croissance en milieu liquide se fait en suivant les variations d'absorbance, soit par prélèvement, soit directement en utilisant des erlenmeyers avec un diverticule adapté à l'appareil de mesure utilisé.

Nous avons utilisé essentiellement deux appareils de mesure : l'électrophoto-

mètre Meunier employé avec un filtre jaune, ou le photomètre Klett employé avec un filtre bleu. Des courbes d'étalonnage (TAVLITZKI, 1949) ont été faites pour connaître la correspondance entre une unité d'absorbance et le nombre de cfc pour chaque appareil et pour des souches haploïdes ou diploïdes.

Pour le Klett cette correspondance est de l'ordre de 10^5 cfc par division du tambour, pour le Meunier de 3×10^4 cfc par division du tambour.

Pour les absorbances élevées, à partir de 200 divisions pour le Klett, il faut faire des corrections, car l'on s'écarte alors de la loi de Lambert-Beer.

Pour obtenir une culture en phase logarithmique pendant plusieurs divisions et déterminer le taux de croissance avec précision, il faut partir d'une culture déjà en phase logarithmique, et ensemencer par dilution dans le même milieu sans changements brusques de température pour éliminer la phase de latence toujours importante chez la levure. Une culture en milieu synthétique est en général en phase logarithmique quand l'absorbance est inférieure à 200 unités Klett.

E - Techniques génétiques .

1. Obtention des diploïdes . On mélange deux cultures de souches haploïdes de signe complémentaire et on cultive le mélange pendant 24 heures. Si les deux souches ont des exigences métaboliques différentes on isole les diploïdes prototrophes sur milieu synthétique gélosé minimal . Quand cela n'est pas possible , le mélange de copulation est incubé pendant 3 - 4 heures en milieu YPGA, liquide ou gélosé, et le zygote est isolé à l'aide du micromanipulateur de Fonbrune. La technique d'isolement est la même que celle utilisée pour la dissection d'asques, qui sera décrite plus loin.

2. Sporulation . La sporulation est induite par le procédé de Mc CLARY, NULTY et MILLER (1959).

Le diploïde est d'abord cultivé sur milieu de présporulation pendant 24 - 48 heures, la culture est centrifugée, lavée trois fois à l'eau distillée, et 10^6 cellules sont incubées dans le milieu de sporulation. Au bout de 3 - 4 jours les asques sont visibles sous le microscope, et on peut procéder à leur dissection.

3. Dissection des asques . La technique utilisée est celle décrite par JOHNSTON et MORTIMER (1959) . La membrane de l'asque est digérée par de l'enzyme d'escargot : suc d'Helix Pomatia stabilisé, standardisé, titre minimum : 100 000 unités de β - glycuronidase (FISHMAN), 50 000 unités sulfatase (WHITEHEAD), Industries Biologiques

Françaises, 35-49, Quai du Moulin de la Cage, à Gennevilliers (Seine). Ampoules de 1 ml. La préparation est additionnée de 15 mg de chlorhydrate de cystéine par ml et conservée congelée à -25°C.

Les proportions relatives sont plus ou moins empiriques, en général on mélange une goutte de suspension cellulaire dans le milieu de sporulation avec trois gouttes d'eau distillée stérile et une goutte de suc d'Helix Pomatia et on incube à 28°C sans agitation jusqu'à ce que la membrane de l'asque soit digérée en veillant à ce que les quatre ascospores de la même tétrade ne soient pas dispersées.

Pour la dissection proprement dite, on utilise une chambre de dissection de Fonbrune, modifiée selon les conseils de F. SHERMAN. On coule 15 ml d'une solution d'agar à 2 % sur des boîtes de Pétri à fond plat. On découpe à l'aide d'une spatule un rectangle de 40 x 25 mm que l'on pose sur une lamelle de verre de 44 x 28 mm. Sur un des bords larges de cette plaquette on étale une anse du mélange d'asques traités par l'enzyme d'escargot. On place le tout sur la chambre à dissection, et à l'aide d'une aiguille en verre étiré avec la microforge de Fonbrune, on isole les quatre spores de chaque tétrade que l'on dépose à 3 mm l'une de l'autre sur le bord de la plaquette opposé à celui où l'on a fait l'étalement . Chaque plaquette permet la dissection de 12 tétrades. On place ensuite la plaquette d'agar sur une boîte de Pétri contenant de l'YPGA gélosé, et au bout de 48 heures, chaque spore pourra donner naissance à une colonie.

4. Analyse des tétrades. Cette analyse consiste à déterminer le phénotype de chaque souche issue de la germination des quatre spores d'un même asque. Chaque colonie est ensemencée en forme de plage de 5 mm environ sur une boîte de Pétri contenant de l'YPGA gélosé, en les disposant à 1 cm environ l'une de l'autre. Dans la même boîte on ensemence aussi le diploïde qui a donné naissance aux spores ainsi que les deux souches parentales. Au bout de deux jours les plages ayant bien poussé, on détermine le phénotype de chaque souche par la technique de repliques à l'aide d'un morceau de velours. Cette technique permet d'ensemencer successivement, en gardant la topographie de la boîte mère, plusieurs milieux synthétiques de composition différente . Nous avons toujours utilisé, dans nos analyses, des milieux synthétiques complets manquant un seul métabolite exigé. Seules, les souches n'exigeant pas le métabolite en question, donneront une croissance au bout de deux jours.

En même temps, on détermine aussi le caractère "grande" ou "petite" en utilisant une boîte de YPGly (seules les souches "grandes" pousseront (SLONIMSKI, 1953)) ainsi que le signe en utilisant, comme dernière boîte de replique, une boîte contenant du GO sur laquelle on étale une suspension cellulaire d'une souche haploïde auxotrophe pour d'autres besoins que ceux analysés. Toute souche haploïde de signe complémentaire copulera avec

cette dernière, en donnant naissance à un diploïde prototrophe qui poussera sur GO.

5. Test fonctionnel d'allélisme (ou test de complémentation) . Il est classique : on croise chaque souche avec une souche de signe complémentaire du même phénotype dont le génotype est connu, et on étudie le phénotype du diploïde obtenu.

6. Test d'hétéroallélisme (ou test de recombinaison génétique) . Pour déterminer quel site est muté pour un allèle donné on croise la souche avec des souches mutées à des sites différents. Le diploïde isolé sera toujours auxotrophe pour l'exigence étudiée.

Si les deux souches sont hétéroalléliques, une recombinaison intracistronique peut avoir lieu et donnera naissance à des cellules prototrophes avec une fréquence élevée (10^{-4} à 10^{-5}). Si les deux souches sont homoalléliques, la recombinaison ne peut pas avoir lieu, et la fréquence de reversion sera 100 à 1000 fois plus faible. Ce test est celui qui a été décrit par ROMAN (1956a).

F - Techniques particulières .

I. Addition des substances aux boîtes de Pétri par aspersion . Quand on veut ajouter une substance à une boîte de Pétri dans laquelle on a déjà étalé une population cellulaire, on peut pulvériser une solution à l'aide d'un vaporisateur à air comprimé, mais il faut éviter que le liquide ajouté se déplace sur la surface de la boîte, en entraînant , par dissociation des microcolonies ou colonies déjà formées, un changement de la topographie de la population cellulaire étalée. Nous avons mis au point une technique qui donne de très bons résultats. Elle consiste à inverser la boîte de Pétri sur un support en aluminium ayant un trou circulaire d'un diamètre légèrement inférieur à celui de la taille de la boîte. On pulvérise la solution du bas vers le haut et les microgouttes qui ne sont pas absorbées sur l'agar retombent, en évitant une accumulation de liquide sur la surface de l'agar qui entraine toujours une certaine dissociation des microcolonies. On peut étalonner le vaporisateur et connaitre ainsi le volume pulvérisé par unité de temps.

2. Purification de l'agar par précipitation à l'isopropanol : 100 g d'agar Difco, enveloppés dans 8 couches de gaze sont lavés sous l'eau courante pendant une nuit.

- Après s'être débarrassé de l'excès d'eau, on lave pendant 3 heures dans HCl 0,01 N et on rince une nuit sous l'eau courante.

- On prépare une solution de l'agar à 10 % à 100°C, on laisse refroidir à 60°C et on ajoute 2,5 vol. d'alcool isopropylique, en agitant fortement.

- On filtre le précipité dans "un buchner" avec trois couches de papier filtre à l'aide du vide.

- on broie dans un agitateur à grande vitesse, du genre Turmix, avec de l'alcool éthylique, et on filtre par le même procédé. On répète cette opération une deuxième fois.

- On enlève le reste d'alcool de l'agar en lavant avec de l'éther éthylique directement sur le "buchner".

- Le produit ainsi obtenu est facilement soluble dans l'eau en ébullition.

3. Mutagenèse par les rayons ultra-violets : on cultive des souches haploïdes sur du milieu YPGA gélosé pour obtenir une bonne dissociation des amas. Les cellules sont récoltées à l'aide d'un étaleur de verre et d'une solution physiologique, puis centrifugées, et le culot lavé deux fois avec la même solution. Les cellules sont mises en suspension dans du tampon phosphate 0,1 M, pH 6,5 à une concentration de 10^7 cellules/ml. 10 ml de cette suspension, contenus dans une boîte de Pétri, sont irradiés à l'aide d'une lampe germicide ; pendant l'irradiation, la suspension est agitée.

CHAPITRE II

INHIBITION DE LA CONVERSION GENIQUE AU LOCUS ad3 PAR L'HISTIDINE

I - INTRODUCTION

Le problème qui nous intéresse est de savoir si le métabolite final d'une chaîne de biosynthèse peut agir sur un évènement génétique le concernant. La conversion génique, chez la levure, permet d'aborder ce genre de problème. Ainsi, tandis que la fréquence de mutation est de l'ordre de 10^{-8} - 10^{-9} , la conversion génique est 1 000 à 10 000 fois plus fréquente.

L'étude de la fréquence de la conversion génique se fait couramment comme l'étude de la mutation reverse, en dénombrant des colonies prototrophes obtenues à partir d'une population de cellules auxotrophes.

Chez une souche dont la mutation conduirait à une exigence unique, la présence du métabolite exigé permettrait la croissance de la souche auxotrophe. Ceci rendrait très difficile la détection des colonies prototrophes parmi des colonies auxotrophes.

L'exigence simultanée en adénine et en histidine chez les souches ad3 nous permet d'étudier l'influence sur la conversion génique de l'un des deux métabolites en l'absence de l'autre.

Rappelons que la conversion génique n'a lieu que chez les souches diploïdes hétéroalléliques.

Au cours du présent chapître nous allons examiner la physiologie des souches ad3 et décrire les expériences qui nous permettent de conclure que l'histidine inhibe spécifiquement la conversion génique au locus ad3 .

II - ETUDE PHYSIOLOGIQUE DES SOUCHES ad3 .

La mutation ad3 sur laquelle nous avons travaillé provient des souches

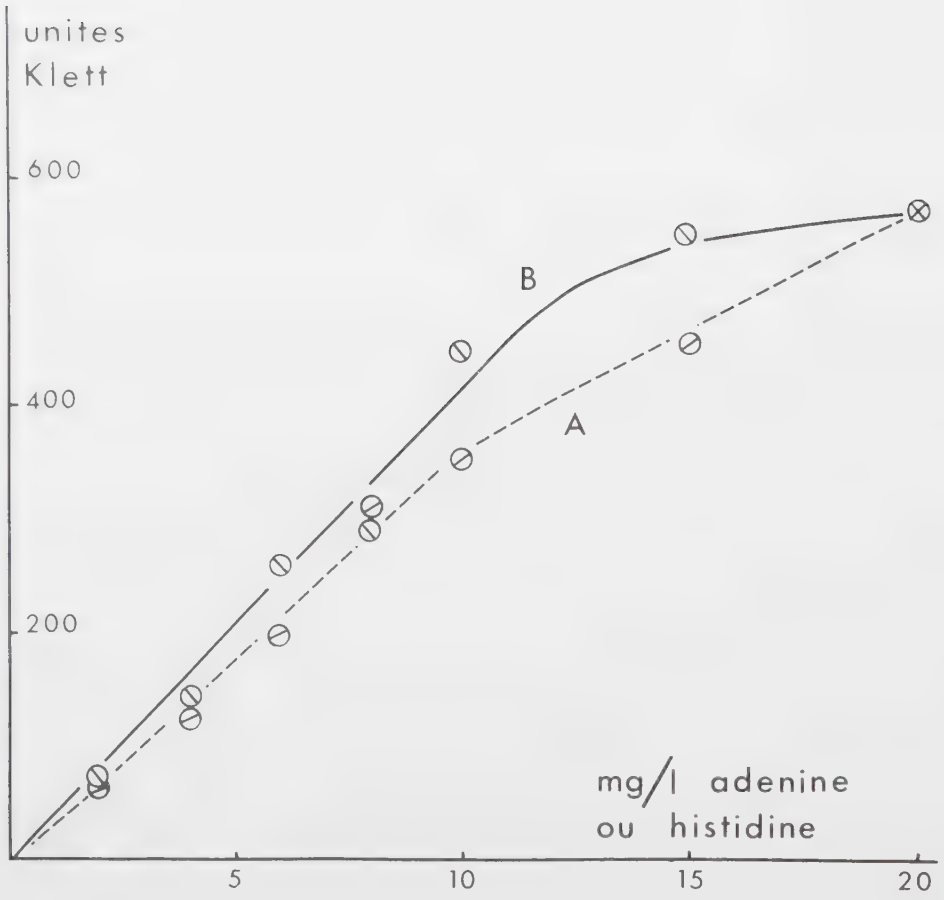


FIGURE 2

Croissance maximale d'une souche ad3, en fonction de la concentration initiale d'adenine ou d'histidine

La souche diploïde homoallélique LM 56, (ad3-3/ad3-3) provenant d'une préculture en milieu naturel (YPGA), est cultivée pendant 48 h. dans du milieu minimal (GO) contenant soit des quantités variables d'adenine et une quantité constante d'histidine (courbe A) soit des quantités variables d'histidine et une quantité constante d'adenine (courbe B) . En abscisse : Concentration en adenine ou histidine variable pour une concentration constante de 20 mg/l de l'autre métabolite .

isolées par ROMAN (1956b) . Avant d'aborder l'étude de la conversion génique, il était indispensable de vérifier les besoins nutritionnels en adénine et en histidine décrits par ROMAN et de déterminer les classiques paramètres de croissance, qui n'ont jamais été caractérisés jusqu'à présent.

A. Rendement de croissance en fonction des concentrations d'adénine et d'histidine

Le rendement est défini comme la quantité de matière vivante synthétisée à partir d'une quantité connue d'une substance limitant la croissance.

Lorsque l'un des métabolites est en excès, le rendement de croissance est proportionnel à la concentration de l'autre (figure 2): I mg d'adénine permet une croissance de 90 mg de poids sec et 1 mg d'histidine de 103 mg. Ni l'un ni l'autre métabolite seul ne permet la croissance des souches ad3.

Le rendement doit être calculé en utilisant soit une souche haploïde, soit une souche diploïde homoallélique . En effet, chez une souche diploïde hétéroallélique, la conversion génique est un évènement fréquent : pendant la phase stationnaire de croissance, (fig. 3, courbe B) la multiplication des cellules prototrophes issues de la conversion génique rend difficile la démonstration de la proportionnalité.

Cette croissance de cellules prototrophes aurait pu être interprétée, au premier abord, comme une complémentation interallélique. Nous insistons sur le fait qu'il s'agit bien de cellules prototrophes issues par recombinaison génétique, car dans toutes les souches diploides portant différentes combinaisons hétéroalléliques ad3, plus de 99, 99 % des cellules étalées sur milieu gélosé minimal ne donnent aucune croissance, même au bout de 15 jours.

B .-Taux de croissance .

Le taux de croissance est défini comme le nombre de divisions cellulaires par unité de temps, lors de la croissance logarithmique. La courbe A de la figure 3 est une courbe de croissance typique de la souche LM 27, diploïde hétéroallélique ad3, souche qui a été largement utilisée au cours de ce mémoire. Dans les conditions de nos expériences, nous obtenons un taux de 0, 67 h^{-1} , qui correspond à un temps de génération de 1, 5 h. Ce temps de génération est sensiblement le même que celui que l'on obtient couramment chez une souche AD3. Remarquons que dans nos expériences nous avons veillé à ce que la souche se trouve vraiment en pleine phase logarithmique pendant la période de détermination du taux. Pour cela, une colonie de petite taille de la souche LM 27 est ensemencée dans du milieu synthétique, et cette préculture, elle même en phase logarithmique, est utilisée pour ensemencer du milieu synthétique frais, préchauffé à la température d'incubation.

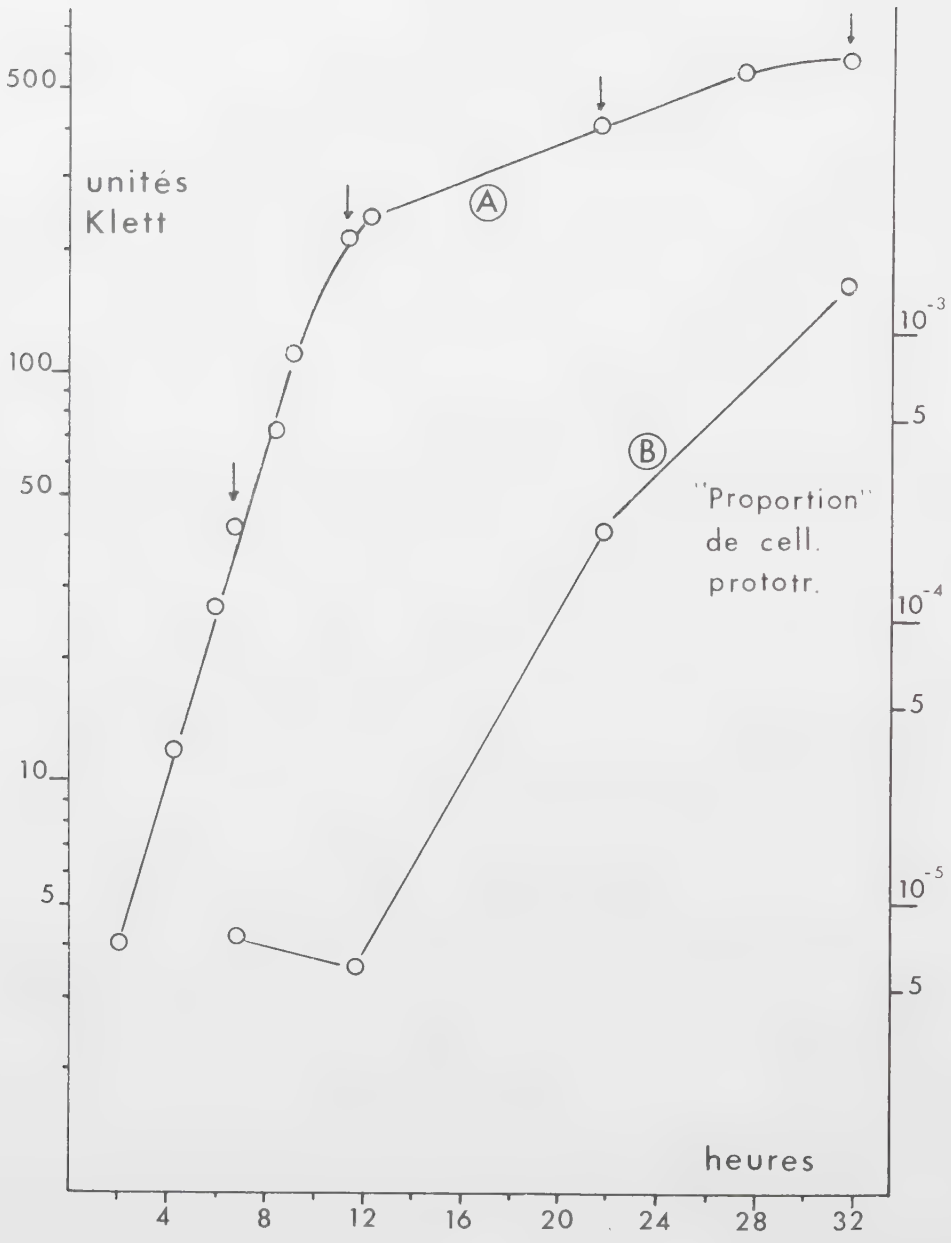


FIGURE 3

Courbe de croissance d'une souche diploïde hétéroallélique ad3 et variation de la "proportion" de cellules prototrophes au cours du temps

Une colonie de la souche LM 27 (ad3-3/ad3-6) est prélevée sur du milieu solide puis ensemencée dans du milieu synthétique contenant de l'adénine et de l'histidine (G8). La culture est agitée à 28° C et quand elle se trouve en phase logarithmique (absorbance 100-200 unités Klett), elle est utilisée pour ensemencer le même milieu G8 frais, préchauffé à la température d'incubation. Courbe A : variation de l'absorbance au cours du temps. Courbe B : détermination de la "proportion" de cellules prototrophes par étalement d'une dilution adéquate de la culture/A en milieu minimal (GO) et milieu G 8. Prélèvement aux points indiqués par les flèches.

En tous cas, ce taux de croissance étant sensiblement le même que celui d'une souche prototrophe, montre bien que l'adénine et l'histidine sont suffisantes pour satisfaire les besoins nutritionnels des souches ad3.

III - ETUDE DE L'INHIBITION DE LA CONVERSION GENIQUE PAR L'HISTIDINE.

A. Mise en évidence

Ayant démontré que les souches ad3 se comportent du point de vue physiologique comme des mutants auxotrophes habituels, nous allons décrire dans ce paragraphe l'expérience qui est le point de départ de tout notre travail.

250 000 cellules d'une souche diploïde hétéroallélique ad3 (LM 27), cultivées préalablement en liquide soit en milieu naturel YPGA, soit en milieu synthétique contenant de l'adénine et de l'histidine en excès, sont étalées sur milieu gélosé minimal. Au deuxième jour les premières colonies apparaissent, une dizaine par boîte. Ce nombre s'accroît ensuite (figure 4, courbe A), pour atteindre un chiffre de 150 au bout de 15 jours.

L'addition d'adénine au milieu d'étalement ne change pas ces résultats. Par contre, l'addition d'histidine inhibe fortement l'accroissement du nombre de colonies prototrophes (figure 4, courbe B).

Les résultats consignés sur la figure 4 correspondent à une expérience type. Plusieurs dizaines d'expériences donnent des résultats concordant entre eux : l'histidine a toujours cet effet considérable.

Nous pouvons définir ici trois paramètres mesurables dans chaque expérience ; "Proportion" : le rapport entre le nombre de colonies prototrophes comptées au deuxième jour et le nombre de cellules auxotrophes étalées ; "Taux" l'accroissement du nombre de colonies prototrophes par jour et par cellule auxotrophe étalée, accroissement mesuré pendant la partie linéaire de la courbe ; "Rendement" : l'accroissement total du nombre de colonies prototrophes par rapport au nombre initial de cellules auxotrophes.

La "proportion" dépend de deux facteurs : des forces de sélection en jeu avant sa détermination et de la fréquence de reversion. Les forces de sélection sont fonction de la conservation et des conditions de préculture, la fréquence de reversion étant une caractéristique de la souche étudiée. Le "taux" et le "rendement" ne dépendent que des conditions de culture sur la boîte de Pétri.

L'inhibition de l'apparition des colonies prototrophes sera appelée dorénavant "effet histidine".

Avant de rentrer dans les détails du phénomène, nous voulons mentionner ici

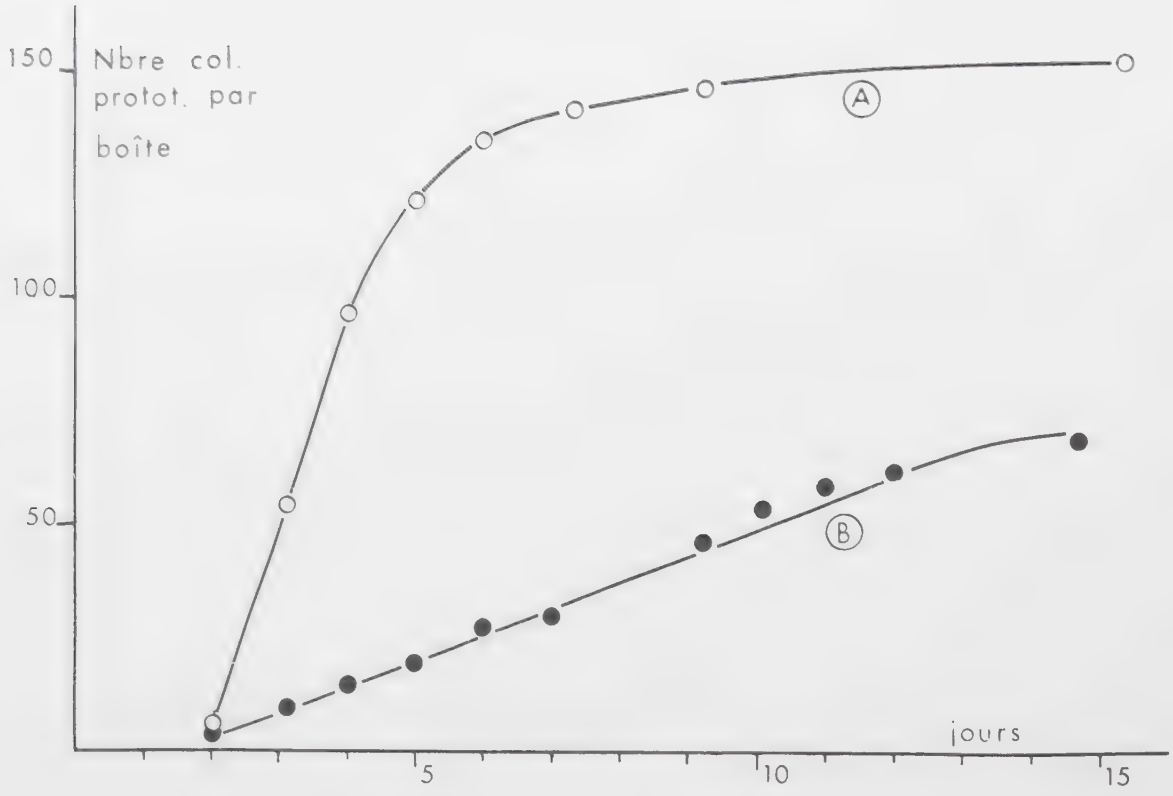


FIGURE 4

Accroissement du nombre de colonies prototrophes au cours du temps lors de l'étalement d'une souche diploide hétéroallélique ad3 en milieu minimal additionné ou non d'histidine

250 000 cellules de la souche LM 27 (ad3-3/ad3-6) provenant d'une culture en milieu naturel (YPGA) sont étalées sur milieu minimal (courbe A), ou minimal contenant de l'histidine à 10 mg/l (courbe B) . Les colonies prototrophes sont dénombrées les jours suivants.

En ordonnées : Nombre de colonies prototrophes par boîte de Pétri (Moyenne de 5 boîtes).

En abscisse : Jour du comptage .

que nous avons pu écarter deux explications classiques mais assez banales de ce genre de phénomène. Ainsi l' "effet histidine" n'est pas dû à l'inhibition par l'histidine, ni de la croissance des cellules prototrophes, ni de la croissance résiduelle des cellules auxotrophes. Non seulement l'histidine n'inhibe pas cette croissance résiduelle, mais elle la stimule. Bien que normalement on ne compte que les colonies visibles à l'oeil nu, le comptage des microcolonies est possible à l'aide du microscope. Ainsi, les cellules auxotrophes étalées sur milieu contenant de l'histidine, tout en ne donnant pas de colonie visible, se divisent quand même pour donner naissance à des microcolonies. Cette croissance résiduelle n'a presque pas lieu en absence d'histidine (figure 5) .

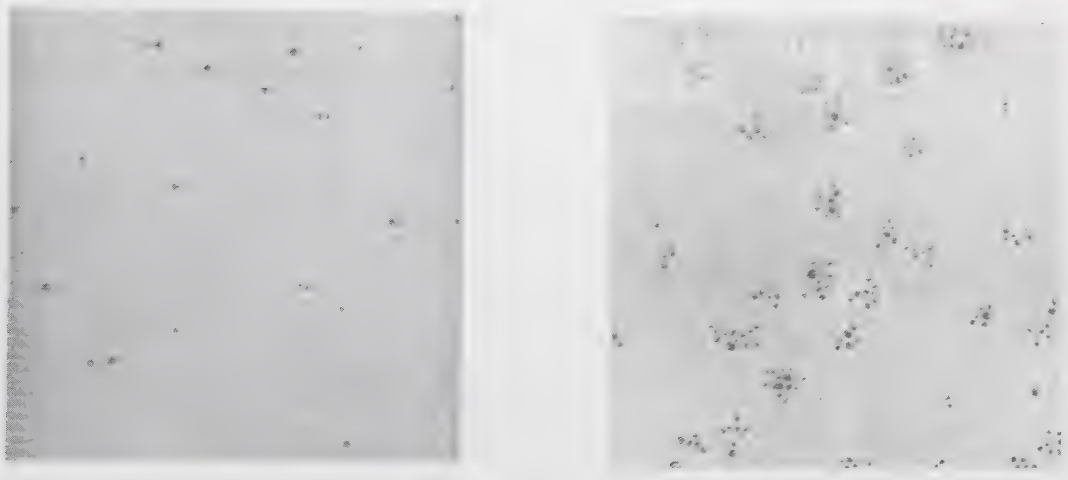


FIGURE 5

Influence de la L-histidine sur la croissance résiduelle d'une souche diploïde hétéroallélique ad3 étalée sur milieu gélosé minimal

Même expérience que celle consignée dans la figure 4.

Microphotographie de la surface de la boîte au bout de deux jours d'incutation.

Photo A : milieu minimal; photo B : milieu minimal plus L-histidine à 10 mg/l.

Mesure de la croissance residuelle			
	Nbre microcol. comptées	Nbre cell. comptées	cell. par microcol.
GO	181	461	2,5
GH	158	1212	7,7
Gh	190	546	2,9

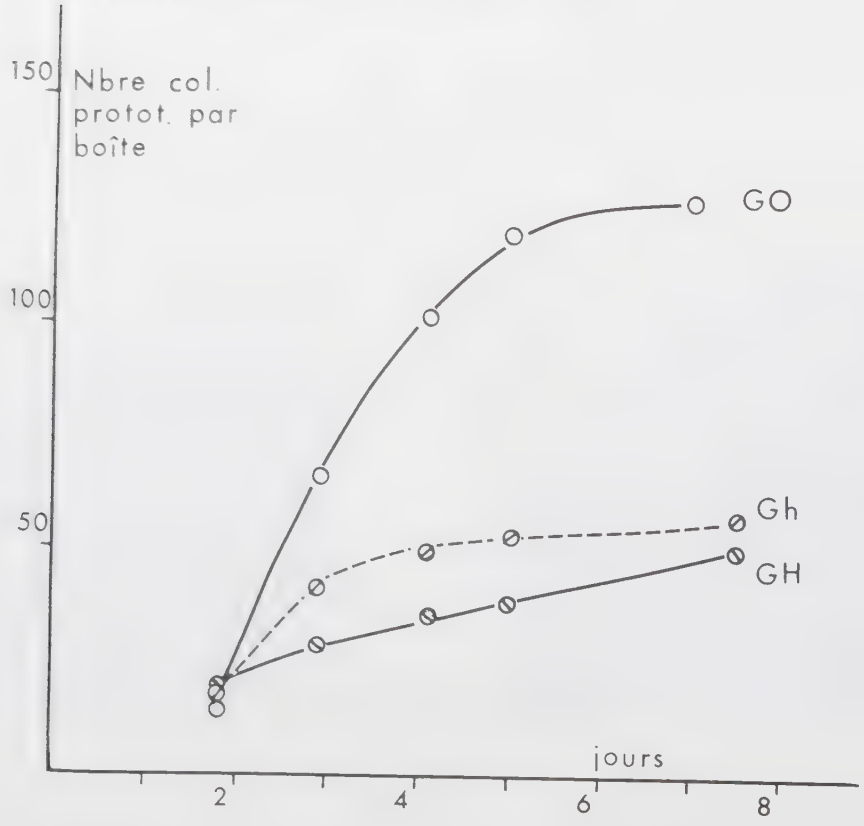


FIGURE 6

Influence de différentes concentrations d'histidine sur l'accroissement du nombre de colonies prototrophes et sur la croissance résiduelle lors l'étalement des cellules auxotrophes d'une souche diploïde hétéroallélique ad3 .

80 000 cellules de la souche LM 27 (conditions de l'expérience consignées dans la figure 4) sont étalées sur milieu minimal (GO), minimal plus histidine à 10 mg/l (GH), minimal plus histidine à 0,05 mg/l (Gh). Les colonies prototrophes sont dénombrées les jours suivants. Après un jour d'incubation la croissance résiduelle est estimée (à l'aide du microscope) par le rapport du nombre de cellules et le nombre de microcolonies comptées. Résultats consignés dans le tableau de la figure.

Par ailleurs, l' "effet histidine" n'est pas forcément lié à cette croissance résiduelle. L'histidine agit de la même façon sur l'accroissement du nombre de colonies prototrophes à une concentration 200 fois plus faible que celle utilisée habituellement (0,05 mg/l au lieu de 10 mg/l), et dans ce cas la croissance résiduelle de cellules auxotrophes est la même qu'en absence d'histidine. La figure 6 résume ces résultats. Des cellules d'une souche diploide hétéroallélique ad3 (LM 27), sont étalées sur trois milieux : minimal (GO), minimal plus 10 mg/l d'histidine (GH) ou minimal plus 0,05 mg/l d'histidine (Gh). Dans cette expérience on détermine d'une part l'accroissement du nombre de colonies prototrophes, et d'autre part le nombre de cellules par microcolonie (comptées un jour après l'étalement). Ainsi, on obtient : 1) le même "rendement" de conversion génique pour deux croissances résiduelles différentes (GH et Gh) et 2) la même croissance résiduelle pour deux "rendements" de conversion génique différents (GO et Gh).

Cette croissance résiduelle dans le milieu contenant de l'histidine à 10 mg/l est due vraisemblablement à des traces d'adénine présentes dans l'agar. En effet, si au lieu d'utiliser du Bacto-agar Difco pour solidifier le milieu d'étalement, on utilise de l'agar extrêmement pur (voir ci-dessous) la présence d'histidine seule ne permet plus cette croissance résiduelle.

Ce résultat nous a conduit logiquement à l'étude de l'influence des traces d'adénine sur la conversion génique elle-même, et ceci a été réalisé grâce aux différentes sortes d'agar utilisées pour solidifier le milieu d'étalement. Nous avons comparé de l'agar ordinaire (Bacto-agar Difco) avec i) de l'agar purifié Difco et ii) de l'agar purifié dans notre laboratoire par précipitation avec l'isopropanol (voir Techniques). Lors de l'étalement d'une souche diploïde hétéroallélique ad3 (LM 27) sur le milieu synthétique solidifié avec l'un ou l'autre de ces agars, un accroissement très faible du nombre des colonies prototrophes est obtenu par rapport à l'accroissement sur l'agar ordinaire (figure 7, A et B). L'addition de traces d'adénine (0,01 mg/l ou 0,1 mg/l) à l'agar purifié Difco suffit pour restaurer l'accroissement du nombre des colonies prototrophes (figure 7 A.) Notons que cans ce cas l'action d'adénine est décelable à des concentrations faibles de l'ordre de 10^{-7} M. Les mêmes quantités d'adénine ajoutées à l'agar purifié par précipitation donnent des résultats différents (figure 7 B.) 0,01 mg/l ne permet pas la restauration de l'accroissement du nombre de colonies prototrophes. Par contre, 0,1 mg/l d'adénine permet cette restauration, l'accroissement étant bien supérieur au témoin. Une quantité d'adénine encore plus élevée (1 mg/l) donne aussi une stimulation de l'accroissement, moins importante que dans le cas précédent. Il faut souligner, toutefois, que l'addition d'histidine, même en présence de 0,1 mg/l d'adénine, inhibe, comme d'habitude, l'apparition des colonies prototrophes (figure 8).

Il n'est pas possible d'interpréter ces expériences en détail. Il est néanmoins évident que la purification de l'agar empêche l'apparition de colonies prototrophes, et de cela

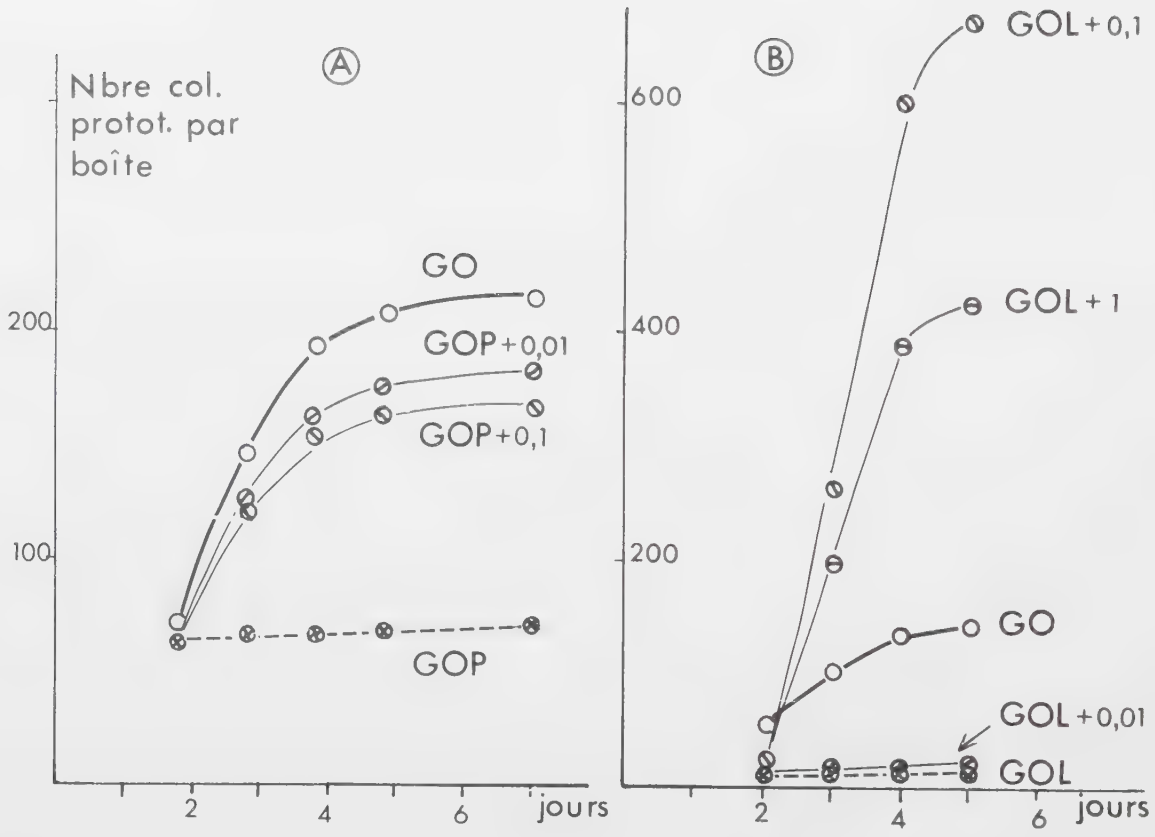


FIGURE 7

Accroissement du nombre de colonies prototrophes au cours du temps lors de l'étalement d'une souche hétéroallélique ad3 en milieu minimal solidifié avec différentes sortes d'agar : Influence de l'addition d'adénine .

Expérience du même type que celle consignée dans la figure 4 .

A : 235 000 cellules de la souche LM 27 sont étalées en milieu minimal solidifié avec : agar ordinaire, (Bacto - agar Difco), GO ; agar purifié Difco, GOP .

B : 285 000 cellules de la même souche sont étalées sur milieu minimal solidifié avecıagar ordinaire, GO ; agar purifié par précipitation à l'isopropanol, GOL .

L'adénine, aux concentrations (en mg/l) indiquées sur les courbes, est ajoutée avant l'étalement.

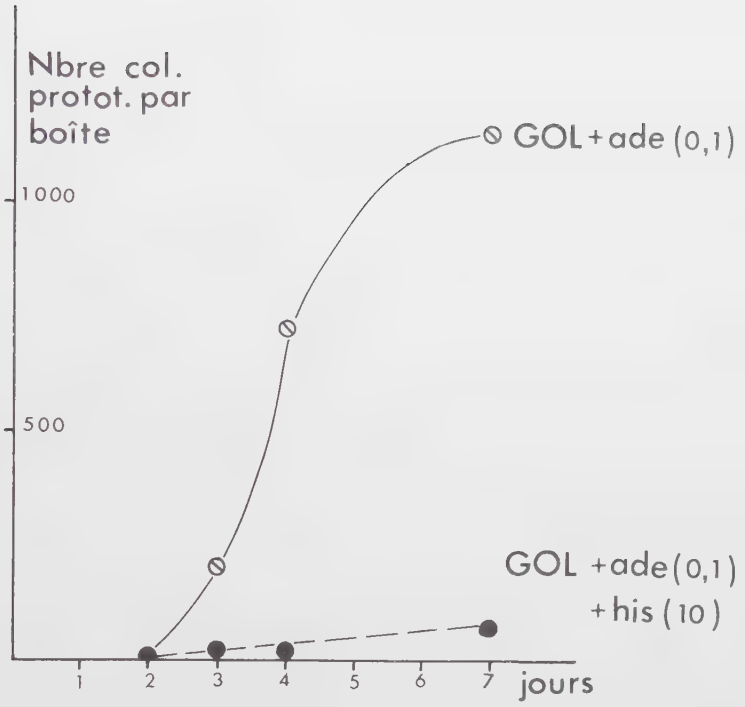


FIGURE 8

Inhibition par l'histidine de l'accroissement du nombre de colonies prototrophes .
Expérience du même type que celle consignée dans la figure 7 B

285 000 cellules de la souche LM 27 sont étalées sur milieu minimal solidifié avec agar purifié par précipitation à l'isopropanol GOL. Les additions (en mg/l) sont indiquées sur les courbes .

on peut conclure que des composés présents dans l'agar (de l'adénine vraisemblablement) en très petite concentration, sont essentiels pour la formation des colonies prototrophes. Puisque nous avons vu que la formation de microcolonies des cellules auxotrophes n'est pas une condition nécessaire pour l'apparition des cellules prototrophes, les traces de ces composés influencent le métabolime des cellules et non leur division. Cette influence du métabolisme a été confirmée par l'étude de la conversion génique en milieu liquide, étude qui sera exposée ultérieurement.

B. Spécificité chimique .

L' "effet histidine" est très spécifique du point de vue chimique. Nous avons essayé plusieurs mélanges d'acides aminés et aucun n'inhibe la conversion génique au locus ad3 (Tableau I) . De plus, l'histidine ajoutée à chaque mélange inhibe l'accroissement de colonies prototrophes de la façon habituelle. D'autres substances apparentées à l'histidine telles que l'urocanate à 7 mg/l, la 3-méthyl histidine à 8 mg/l ou la D-histidine à 50 mg/l, n'ont aucun effet inhibiteur. Cette dernière substance a des propriétés particulières : elle stimule légèrement l'accroissement du nombre de colonies prototrophes et lève l'inhibition provoquée par la L-histidine. Nous reviendrons sur cette action dans un instant.

C. Spécificité génétique

L' "effet histidine" a été étudié d'abord sur le diploide hétéroallélique ad3-3/ad3-6. CLAVILIER (1962) a montré qu'à l'intérieur du locus ad3 , toutes les combinaisons hétéroalléliques entre quatre hétéroallèles différents, ne se complémentant pas, répondent à l'histidine d'une façon semblable. Ceci nous permet de dire que l' "effet histidine" n'est pas limité à la combinaison ad3-3/ad3-6, mais que l'histidine agit sur plusieurs combinaisons hétéro alléliques à l'intérieur du locus ad3 .

L' "effet histidine" pourrait être un cas particulier d'un phénomène plus général, c'est-à-dire de l'action de l'histidine sur toute conversion génique. CLAVILIER (1962) a démontré que ceci n'est pas le cas. Ainsi l'histidine n'agit pas sur la conversion génique au locus th2, gène qui régit une étape dans la biosynthèse de l'homosérine, étape qui conduit aux besoins simultanés en thréonine et méthionine. L'expérience a été réalisée aussi bien sur une souche diploïde hétéroallélique seulement pour th2 que sur une souche diploïde hétéroallélique à la fois pour th2 et pour ad3 . Chez cette dernière souche l'histidine agit toujours sur la conversion génique au locus ad3 et n'agit pas sur la conversion génique au locus th2 .

Le gène th2, où un évènement génétique aboutit aux besoins simultanés en deux métabolites, présente un parallèle évident avec le gène ad3 . Ceci nous a conduit à étudier l'effet des produits finaux, thréonine et méthionine sur la conversion génique aux loci qui gouvernent leur biosynthèse. A part le locus th2 , deux autres loci, th3 et th6 ,

TABLEAU N° I

Spécificité chimique de " l'effet histidine " : influence de l'addition de différents mélanges d'acides aminés sur la conversion génique au locus ad3 .

Mélanges d'acides aminés additionnés .	"Rendement" de conversion génique : accroissement du nombre de colonies prototrophes (2 à 5 jours) par rapport à 10^4 cellules auxotrophes étalées.	
	Addition de mélanges d'acides aminés	Addition d'histidine (10 mg/l) aux mélanges précédents .
Sans additions (témoin)	12	0,9
A : val, ile, leu	11	2,9
B : asp, glu, thr, met	9,6	2,0
C : arg, ala, pro, thr, met	11	2,0
D : gly, cys, ser	14	1,2
E : tyr, phe, gly, cys, arg	14	2,2
F : lys, try, glu, gly	9,2	2,0

110 000 cellules de la souche LM 27 (ad3-3/ad3-6) provenant d'une culture en milieu naturel (YPGA) sont étalées sur milieu synthétique minimal (témoin), ou additionné de différents mélanges d'acides aminés. Une autre série de mêmes milieux contient en plus de l'histidine à 10 mg/l. Les colonies prototrophes sont dénombrées, et l'accroissement de leur nombre (moyenne de 5 boites) entre le 2ème et 5ème jour après l'étalement, par rapport à 10^4 cellules auxotrophes étalées, est consigné sur le tableau.

Concentration finale (en mg/l) de chaque acide aminé dans les mélanges utilisés : val, 26 ; ile, 14 ; leu, 22 ; asp, 14 ; glu, 35 (B) et 70 (F) ; thr, 10 (B) et 16 (C) ; met, 6 (B) et 9 (C) ; arg, 11 (C) et 27 (E) ala, 10 ; pro, 34 ; gly, 50 (D), 12 (E) et 8 (F) ; cys, 12 (D) et 3,5(E ser , 0,1 ; tyr, 10 phe, 27 ; lys, 32 ; try, 5 .

régissent aussi la biosynthèse de l'homosérine, précurseur de la thréonine et de la méthionine. CLAVILIER (1962) a montré qu'aucun des deux métabolites n'agit sur la conversion génique au locus th2 . Nous avons réalisé le même genre d'expérience avec des souches diploïdes hétéroalléliques pour th3 et th6, et un résultat similaire a été obtenu ; ni la thréonine, ni

La méthionine n'influence la conversion génique aux loci th3 et th6 (Tableau 2).

TABLEAU N° 2

Influence de la threonine et de la méthionine
sur la conversion génique aux loci th3 et th6.

Génotype des Souches	Rendement de conversion génique		
	Milieux d'étalement		
	Minimal	Minimal plus threonine à 100 mg/l	Minimal plus methionine à 100 mg/l
th3-1/th3-3	7.4×10^{-6}	9.1×10^{-6}	5.5×10^{-6}
th6-1/th6-2	19.8×10^{-6}	21.0×10^{-6}	19.2×10^{-6}

La culture des souches et le dénombrement des colonies prototrophes sont réalisées dans les mêmes conditions que celles consignées dans le Tableau 1

th3 : 580 000 cellules de la souche LM 125 (th3-1/th3-3) sont étalées sur les différents milieux. Le "rendement" est calculé entre le 2ème et le 5ème jour après l'étalement.

th6 : 900 000 cellules de la souche LM 131 (th6-1/th6-2) sont étalées sur les mêmes milieux. Le "rendement" est calculé entre le 2ème et le 4ème jour après l'étalement. (La souche LM 131 est homozygote pour le gène ad2 : le milieu minimal est donc supplémenté en adénine).

D. Cinétique

Nous avons vu que lorsque une population de cellules diploïdes hétéroalléliques ad3 est étalée sur du milieu minimal, il y a un accroissement du nombre des colonies prototrophes au cours du temps.

Cet accroissement peut être expliqué "à priori" par une hypothèse simple : toute colonie prototrophe qui apparaît à un temps donné correspond à une conversion génique qui s'est produite deux jours plus tôt, car deux jours est le temps nécessaire à une cellule pour donner naissance à une colonie visible à l'oeil nu. Il est facile de mettre à l'épreuve cette hypothèse en utilisant l' "effet histidine" . Si l'histidine est ajoutée au temps t après l'étalement et si l'accroissement du nombre des colonies prototrophes est dû à des évènements

qui ont lieu avec une probabilité égale au cours du temps, l'accroissement du nombre des colonies prototrophes devrait se manifester à un temps 2 jours + t. Les résultats attendus selon cette hypothèse sont résumés dans la figure 9 A. Par contre, la figure 9 B montre les résultats de l'expérience effectivement réalisée : 200 000 cellules de la souche LM 27 sont étalées sur milieu minimal et l'histidine est ajoutée par pulvérisation aux temps 0, 1, 2, 4, 8 et 24 heures.

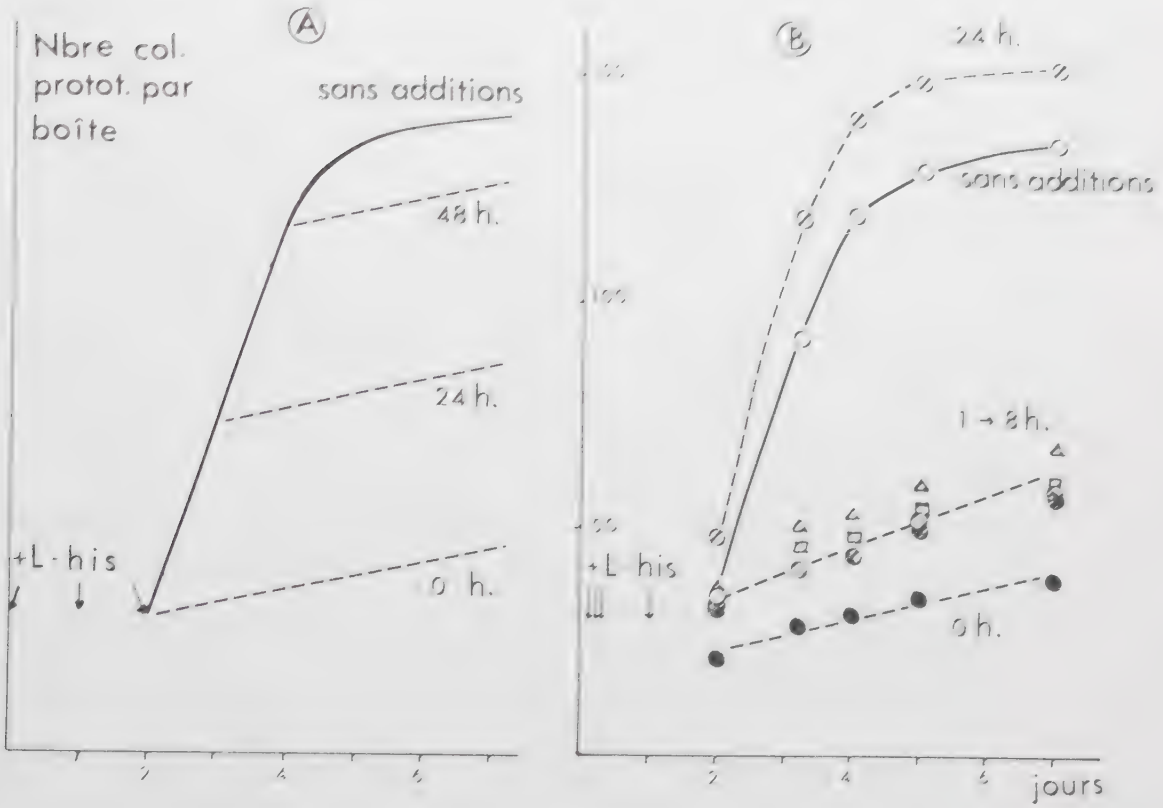


FIGURE 9

Cinétique d'addition de la L-histidine : accroissement du nombre de colonies prototrophes au cours du temps, lors de l'étalement d'une souche diploïde hétéroallélique ad3 en milieu minimal sur lequel l'histidine est ajoutée à des temps différents

A : courbe attendue dans l'hypothèse d'un événement génétique à probabilité égale au cours du temps (voir texte)

B : courbe expérimentale : 230 000 cellules de la souche LM 27 (ad3-3/ad3-6) provenant d'une culture en YPGA sont étalées sur 35 boîtes de milieu minimal. Aux temps indiqués sur les courbes, 5 boîtes sont pulvérisées avec une solution de L-histidine (conc. finale sur la boîte : 10 mg/l). Les colonies prototrophes sont dénombrées les jours suivants .

Ainsi l'histidine ajoutée depuis le temps 0 jusqu'au temps 8 heures inhibe l'accroissement de colonies prototrophes, tandis que l'histidine ajoutée au bout de 24 h., ne l'inhibe plus.

L'étude de la cinétique a été abordée non seulement par l'addition de l'histidine, mais aussi par sa "soustraction".

La technique de "soustraction" couramment utilisée, consiste à étaler la population cellulaire non pas directement sur la boîte de Pétri, mais sur une membrane de cellophane, que l'on peut ensuite transférer sur un autre milieu. Cette expérience a été réalisée par CLAVILIER (1962) qui a trouvé qu'une incubation de 16 h. en milieu minimal contenant de la L-histidine était suffisante pour provoquer une inhibition de l'accroissement de colonies prototrophes même après transfert sur un milieu ne contenant plus d'histidine.

La technique de transfert de membranes a le désavantage d'être très laborieuse. L'addition d'une substance levant l'inhibition provoquée par la L-histidine, permettrait d'atteindre le même résultat plus facilement. Une substance avec de telles propriétés est la D-histidine. Elle n'inhibe pas la conversion génique au locus ad3 ; par contre, quand elle est ajoutée à des boîtes contenant de la L-histidine, elle lève l'inhibition provoquée par cette dernière (figure 10). Remarquons que cet antagonisme n'a lieu qu'à une concentration de D-histidine de 5 à 10 fois supérieure à celle de la L-histidine.

Nous avons utilisé ces propriétés pour préciser la cinétique de l' "effet histidine". Nous avons réalisé des expériences d'addition de la L-histidine sur milieu minimal et l'addition parallèle de la D-histidine sur milieu minimal contenant de la L-histidine en partant de la même suspension cellulaire étalée. La figure 11 représente le "rendement" de conversion génique en fonction du temps d'addition de l'une ou l'autre substance.

L'addition au temps O de la L- et de la D-histidine ensemble , ou l'addition de la L-histidine au temps 24 h. donne un résultat identique, puisque l'on retrouve la même valeur du "rendement", $4,2 \times 10^{-4}$. Symétriquement, l'addition de la L-histidine au temps O donne la même valeur du "rendement", $0,8 \times 10^{-4}$, que l'addition tardive (24 h) de la D-histidine à des boîtes contenant de la L-histidine.

On peut remarquer que le profil de la courbe d'addition de la D-histidine est différent de celui de la courbe d'addition de la L-histidine. L'addition de la D-histidine pendant les premières heures stimule la conversion génique. Cette stimulation pourrait être dûe au fait que la D-histidine ne lève pas seulement l'inhibition provoquée par la L-histidine ajoutée de l'extérieur, mais qu'elle lève aussi une faible inhibition provoquée par le niveau interne de L-histidine. Indépendamment de cette stimulation, on peut déduire que la conversion génique n'a pas lieu avant la huitième heure, parce que aussi bien l'addition que la "soustraction" de l'histidine à ce temps ne change pas beaucoup le "rendement" de la conver-

sion génique. Elle doit avoir lieu entre la huitième et la vingt-quatrième heure après étalement, et elle présente un considérable délai d'expression phénotypique, car l'histidine ajoutée un jour seulement après l'étalement n'empêche pas l'apparition de nouvelles colonies prototrophes, même 7 jours après (figure 9B).

Ces résultats pourraient être interprétés autrement. Nous pourrions dire que la conversion génique a lieu avec une probabilité égale au cours du temps, mais que sa sensibilité vis-à-vis de l'histidine n'est pas homogène. Il faudrait donc admettre une période

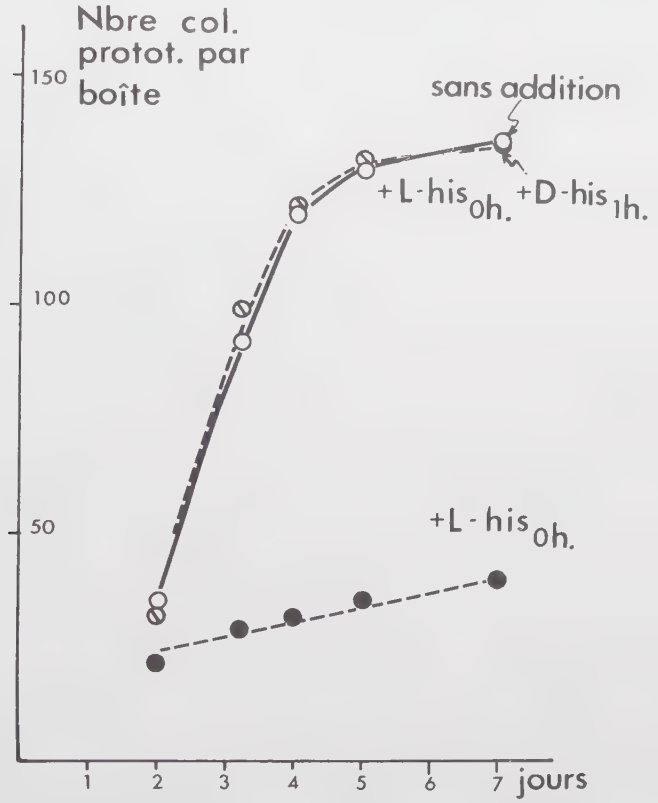


FIGURE 10

Levée par la D-histidine de l'inhibition de l'accroissement du nombre de colonies prototrophes provoquée par la L-histidine, lors de l'étalement d'une souche diploïde hétéroallélique ad3

La même suspension que celle utilisée dans l'expérience antérieure (fig. 9) est étalée sur 35 boîtes de milieu minimal additionné de L-histidine à 10 mg/l. Après une heure d'incubation, 5 boîtes sont pulvérisées avec de la D-histidine (conc. finale sur la boîte 100 mg/l). Les colonies prototrophes sont dénombrées les jours suivants .

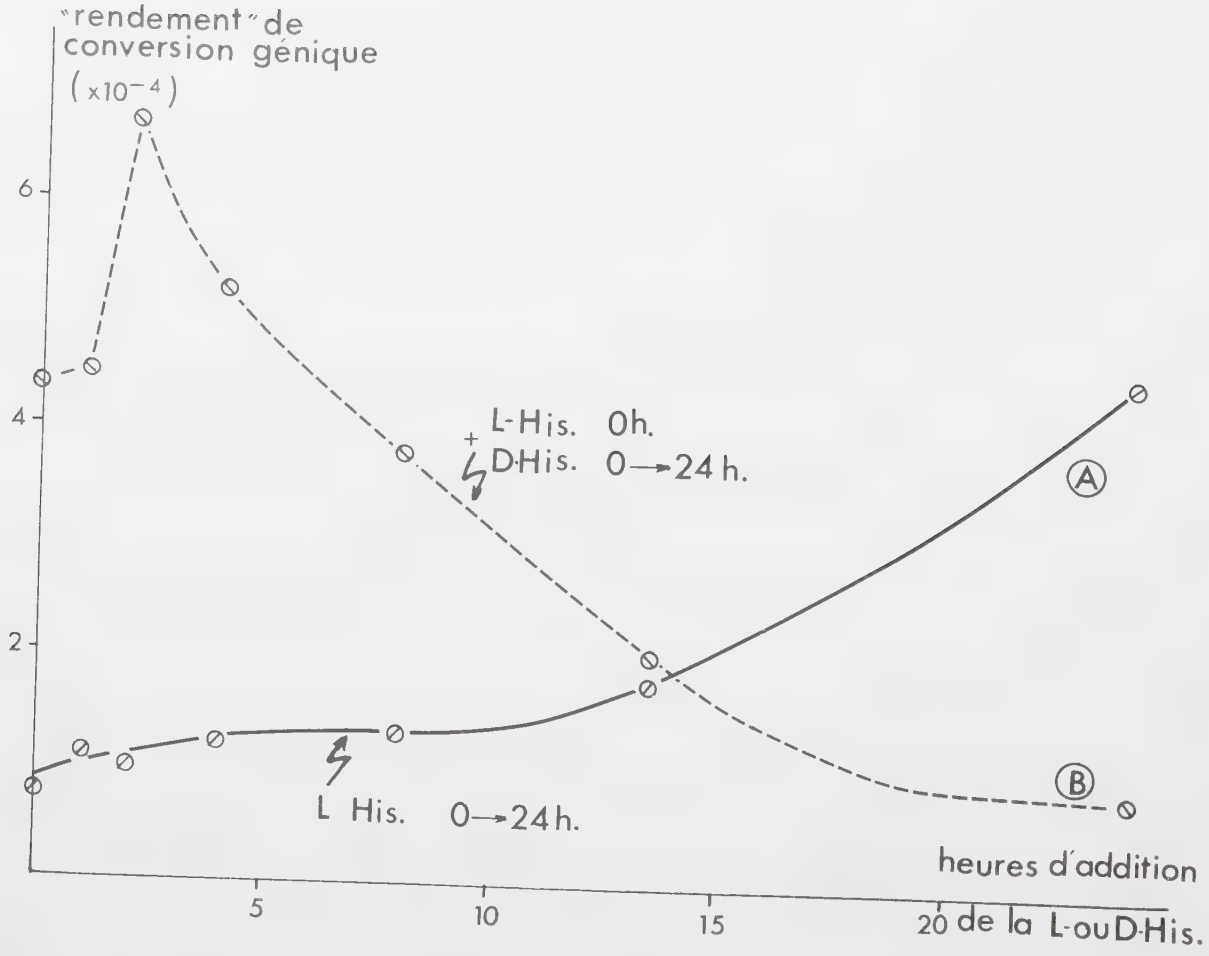


FIGURE 11

Variation du "rendement" de conversion génique d'une souche diploïde hétéroallélique ad3 en fonction du temps d'addition de la L-histidine sur des boîtes de milieu minimal ou de la D-histidine sur des boîtes de milieu additionné de L-histidine

Même expérience que celles décrites dans les figures 9 et 10.

"Rendement" de conversion génique : accroissement du nombre de colonies prototrophes entre le 2ème et le 7ème jour après étalement, par rapport au nombre de cellules auxotrophes étalées.

Courbe A : La suspension cellulaire est étalée sur 35 boîtes de milieu minimal. Aux temps indiqués en abscisses, 5 boîtes sont pulvérisées avec de la L-histidine.

Courbe B : La suspension cellulaire est étalée sur 35 boîtes de milieu minimal contenant de la L-histidine. Aux temps indiqués en abscisses, 5 boîtes sont pulvérisées avec de la D-histidine.

sensible pendant laquelle l'histidine pourrait inhiber la conversion génique. Pour des raisons qui seront discutées plus loin, cette hypothèse nous paraît peu vraisemblable.

E. Démonstration .

L'étude de la fréquence de la conversion génique se fait couramment en milieu gélosé. Ceci présente l'avantage d'une localisation géographique du clone (colonie) issu de la cellule où l'évènement génétique a eu lieu. Il existe, par contre, un désavantage : il est très difficile de contrôler à chaque instant des conditions de culture telle que la diffusion des métabolites qui doit être essentiellement variable. Ce genre d'inconvénient n'existe pas en milieu liquide, mais on se heurte alors à l'impossibilité de distinguer les individus issus directement de la conversion génique de ceux issus de leur multiplication végétative. Cette dernière difficulté n'est pas particulière aux études concernant la conversion génique : elle est générale en microbiologie pour toute étude d'évènement génétique qui se traduit par le passage de l'auxotrophie à la prototrophie. Nous avons résolu cette difficulté par une technique que nous allons exposer .

1. Principe de la technique : le problème qui se pose donc, est de distinguer les cellules AD3 issues de la conversion génique, de cellules AD3 issues des premières par multiplication végétative (figure 12 A). Ceci est possible grâce à certaines propriétés parti-

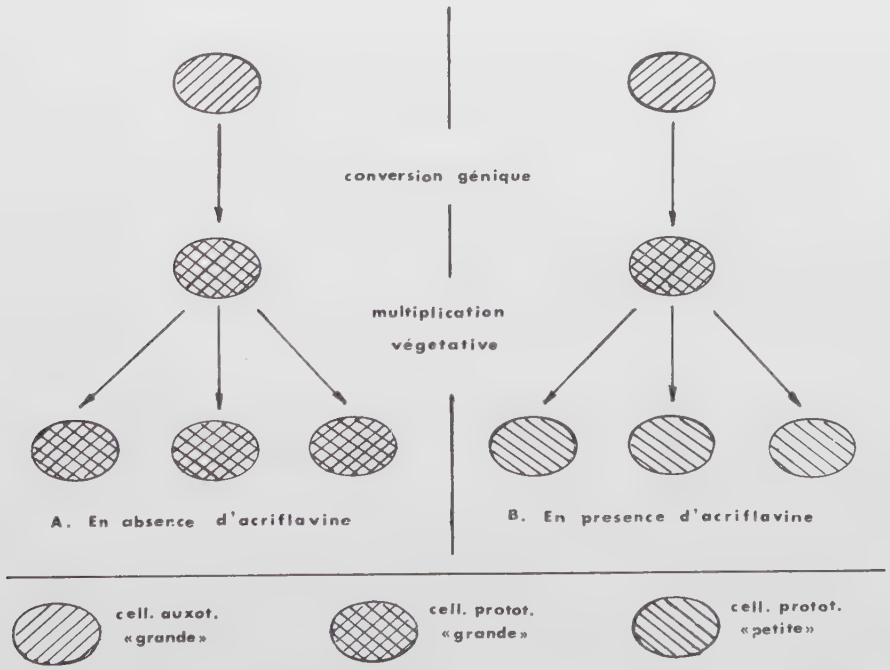


FIGURE 12

Devenir d'une cellule diploïde hétéroallélique ad3 après conversion génique

cellules de la levure. Ce microorganisme est capable normalement de métaboliser les sources de carbone par voie fermentative et par voie respiratoire. Une population de cellules de levure étalée sur milieu gélosé donne, après quelques jours, deux tailles différentes de colonies, grandes et petites ; la proportion de ces dernières est de l'ordre de 10^{-2}. Elles sont dûes à une mutation spontanée cytoplasmique, appelée "petite colonie" (EPHRUSSI, HOTTINGUER, et CHIMENES, 1949). Ces mutants ne sont plus capables de métaboliser les sources de carbone par voie respiratoire (SLONIMSKI, 1949) et ne reversent jamais. Pour la commodité de l'exposé, nous les appelerons dorénavant "petites" et la souche ne présentant pas cette caractéristique sera dite "grande".

Il est aisé de distinguer les cellules "grandes" et "petites" par étalement sur un milieu appelé "différentiel", qui contient du glycérol à 2 % et du glucose à 0,1 %. Les cellules "grandes" peuvent utiliser le glycérol par voie respiratoire ; par contre les "petites" utiliseront seulement les traces de glucose par voie fermentative. Ceci conduit à deux tailles bien différentes de colonies, que l'on peut dénombrer facilement.

La mutation "grande" vers "petite" peut être induite par l'acriflavine avec un rendement voisin de 100 %. EPHRUSSI et HOTTINGUER (1951) ont montré que l'acriflavine transforme les bourgeons issus d'une cellule "grande" en cellules "petites". Cette action s'exerce essentiellement sur la descendance de la cellule mère.

Ainsi une population de cellules "grandes", diploïdes hétéroalléliques pour ad3 peut être incubée en milieu minimal contenant de l'acriflavine et seules les cellules prototrophes (issues de la conversion génique) pourront se multiplier. Leur descendance sera du type "petite", la cellule mère restant du type "grande".

En admettant que : 1) tout bourgeon est transformé en "petite", 2) que toute cellule mère prototrophe reste "grande" et 3) que les cellules auxotrophes ne font aucune division et de ce fait restent "grandes", après quelques générations la population sera formée de trois types de cellules (figure 12B) : des cellules auxotrophes "grandes", des cellules prototrophes "grandes" et des cellules prototrophes "petites". Il est facile de dénombrer ces trois types de cellules par étalement de la population sur milieu "différentiel", soit complet, soit minimal. Le nombre de colonies prototrophes "grandes" par rapport au nombre de colonies auxutrophes "grandes" nous permet de connaître la fréquence de l'évènement génétique ad3 vers AD3. Ceci ne peut être réalisé qu'en présence d'acriflavine, car, en son absence, comme on peut le voir dans la figure 12A, le nombre de colonies prototrophes "grandes" par rapport au nombre de colonies auxotrophes "grandes", ne réflète aucunement la fréquence de cet évènement génétique.

Par la même occasion cette technique nous permet de connaître le devenir des cellules auxotrophes et l'influence de l'histidine sur la croissance des cellules prototrophes.

2. Détermination des conditions optimales de l'action de l'acriflavine :

C'est en fabriquant artificiellement un mélange de cellules auxotrophes ad3-3/ad3-3 et cellules prototrophes AD3/ad3, que nous avons déterminé les conditions optimales de l'action de l'acriflavine. En d'autres termes, les conditions qui sont nécessaires pour que les premises citées plus haut soient satisfaites. Les cellules prototrophes employées dérivent de colonies issues de conversion génique du diploïde ad3-3/ad3-6. Le mélange ainsi obtenu mime une population de cellules diploïdes hétéroalléliques ad3.

Cette façon de procéder est appelée couramment en microbiologie, expérience de reconstitution. Elle présente un avantage double : on connaît exactement les proportions relatives de cellules auxotrophes et prototrophes au début de l'incubation, et, d'autre part, le nombre de cellules prototrophes ne s'accroît que par multiplication végétative, la reversion du diploïde ad3 homoallélique vers la prototrophie étant extrêmement rare.

a) pH : le tableau 3 montre que l'acriflavine à pH 4, 5 est presque sans effet mutagène.

TABLEAU N° 3

Expérience de reconstitution : Influence du pH du milieu d'incubation sur l'effet mutagène de l'acriflavine

Temps d'incubation	NOMBRE DE CELLULES PHOTOTROPHES PAR ml								
	pH 4, 5 Acriflavine 10^{-5} M			pH 6, 1 acriflavine 5×10^{-6} M					
	sans additions			sans additions			plus histidine		
	"grandes"	"petites"	% de "ptes"	"grandes"	"petites"	% de "ptes"	"grandes"	"petites"	% de "ptes"
0 h.	1×10^{2}	0	0	$1,1 \times 10^{2}$	0	0	$1,1 \times 10^{2}$	0	0
16 h.	$8,4 \times 10^{3}$	$1,4 \times 10^{3}$	14 %	$0,6 \times 10^{2}$	1×10^{4}	99,8 %	$1,1 \times 10^{2}$	$2,8 \times 10^{3}$	96 %
23 h.	$1,4 \times 10^{4}$	$2,9 \times 10^{3}$	17 %	$0,02 \times 10^{2}$	$4,1 \times 10^{4}$	100 %	$0,8 \times 10^{2}$	3×10^{3}	97 %
40 h.	$3,1 \times 10^{5}$	$5,3 \times 10^{4}$	15 %	$0,2 \times 10^{2}$	$1,4 \times 10^{5}$	100 %	1×10^{2}	$1,5 \times 10^{3}$	94 %

Un mélange de reconstitution formé de 10^{7} cellules de la souche LM 56 (ad3-3/ad3-3) et de 10^{2} cellules de la souche LM 2 (AD3/ad3) est incubé en milieu minimal contenant de l'adénine à 5 mg/l et de l'acriflavine. La concentration de cette dernière, le pH et les autres additions sont consignés dans le tableau. Aux temps indiqués, des dilutions adéquates sont étalées sur milieu différentiel minimal en vue de dénombrer les colonies "prototrophes "grandes" et "petites".

même si sa concentration est deux fois plus élevée qu'à pH 6,1 . Ceci est compréhensible (MARCOVICH, 1953), car l'action de l'acriflavine est faible à pH acide. Par contre, à pH 6,1 le pourcentage de "petites" est voisin de 100 % .

b) nombre de cellules : lors de l'étude du pH optimal, nous nous sommes aperçus que l'histidine inhibait la croissance des cellules prototrophes. Ceci pouvait être dû au nombre élevé de cellules auxotrophes présentes (GRIGG, 1952). Nous avons vérifié ce point en faisant varier les proportions relatives de cellules auxotrophes et prototrophes dans le mélange de reconstitution. Le tableau 4 résume ces expériences. Dans un premier temps, nous avons gardé constant le nombre de cellules prototrophes et fait varier celui des cellules auxotrophes. On voit que lorsque ce dernier est de 10^7/ml, il y a inhibition de la croissance de cellules prototrophes par l'histidine, que l'acriflavine soit ou non présente.

Dans une deuxième série d'expériences, le nombre de cellules auxotrophes restant constant (10^6/ml), nous avons fait varier celui des cellules prototrophes. L'histidine n'a alors pas d'action sur la croissance des cellules prototrophes, quelque soit le nombre.

Nous voyons donc que le nombre de cellules auxotrophes ne doit pas dépasser 10^6/ml, et que la proportion de cellules prototrophes est secondaire. Pour des raisons de comptage nous avons fréquemment employé des mélanges de reconstitution comportant 500 cellules prototrophes par ml.

c) Concentration d'acriflavine : Nous avons étudié l'effet d'une gamme de concentrations d'acriflavine depuis 10^{-6}M jusqu'à 5×10^{-6}M. Dans la figure 13, le nombre de colonies prototrophes "grandes" après 23 h. d'incubation, est porté en fonction de la concentration d'acriflavine. Pour les concentrations les plus faibles, le nombre de cellules prototrophes "grandes" s'accroît (100 fois pour la concentration 10^{-6}M), ce qui indique que des cellules prototrophes ont échappé à l'action mutagène de l'acriflavine. Quand la concentration d'acriflavine est augmentée, le nombre des cellules prototrophes "grandes" diminue. Un palier est atteint à partir de la concentration 4×10^{-6} M. Cependant à cette concentration le nombre de cellules prototrophes est inférieur à celui du départ ; ceci pourrait être dû à un effet sur la cellule mère soit toxique soit mutagène. Ce problème a été étudié en détail dans le paragraphe suivant .

d) Effet toxique ou mutagène de l'acriflavine sur la cellule mère : la figure 14 montre la variation du nombre de cellules prototrophes "grandes" pendant l'incubation du mélange de reconstitution (courbe A), ou de la souche diploïde hétéroallélique seule (courbe B) dans un milieu contenant de l'acriflavine. Dans le mélange de reconstitution, le nombre de cellules prototrophes "grandes " s'accroît dans les premières heures, pour décroître ensuite d'une manière quasi linéaire. L'accroissement initial peut être expliqué par le fait que les cellules prototrophes proviennent d'une culture en phase exponentielle ; chaque cellule a en moyenne un bourgeon qui se détache sans être touché par l'acriflavine. En effet, le nombre

TABLEAU N° 4

Expérience de reconstitution :

Influence de la proportion variable de cellules auxotrophes et protòtrophes sur l'inhibition par l'histidine de la croissance de ces dernières

TEMPS		AUXOTROPHES VARIABLES PROTOTROPHES CONSTANTS						AUXOTROPHES CONSTANTS PROTOTROPHES VARIABLES			
0 h.	Cellules auxotrophes/ml	$0,85 \times 10^7$		$0,78 \times 10^6$		$0,67 \times 10^5$		$0,75 \times 10^6$		$0,8 \times 10^6$	
	Cellules prototrophes/ml	97		91		96		82		10	
		0	H	0	H	0	H	0	H	0	H
23 h.	Cellules auxotrophes/ml	$0,95 \times 10^7$	$2,2 \times 10^7$	$0,71 \times 10^6$	$1,5 \times 10^6$	4×10^5	5×10^5	$0,93 \times 10^6$	$2,2 \times 10^6$	$0,82 \times 10^6$	$2,5 \times 10^6$
	Cellules prototrophes/ml	$2,1 \times 10^5$	$7,2 \times 10^3$	$4,8 \times 10^5$	$3,9 \times 10^5$	3×10^5	$3,7 \times 10^5$	$3,3 \times 10^5$	$3,4 \times 10^5$	$4,4 \times 10^4$	$5,3 \times 10^4$
	Nombre de générations des cellules prototrophes	11	6,2	12,3	12	11,5	11,8	11,9	11,9	12	12,3
	Plus acriflavine 5×10^{-6} M										
	Cellules auxotrophes/ml	$1,0 \times 10^7$	$1,45 \times 10^7$	$0,78 \times 10^6$	$2,6 \times 10^6$	$1,25 \times 10^5$	$1,85 \times 10^5$	$0,85 \times 10^6$	$2,5 \times 10^6$	$0,7 \times 10^6$	$2,3 \times 10^6$
	Cellules prototrophes/ml	$5,3 \times 10^4$	$1,2 \times 10^4$	$7,1 \times 10^4$	$7,7 \times 10^4$	$3,6 \times 10^4$	$5,2 \times 10^4$	$6,7 \times 10^4$	$7,9 \times 10^4$	$6,5 \times 10^3$	$9,7 \times 10^3$
	Nombre de générations des cellules prototrophes	9	6,9	9,5	9,7	8,5	9	9,6	9,9	9,3	9,9

Même mélange de reconstitution que celui utilisé dans l'espérience consignée dans le tableau 3 .

Quantité d'adénine : 0,5 µg par 10^6 cellules auxotrophes. pH d'incubation : 6,1 .

0 : sans additions ; H : plus histidine à 10 mg/l .

Etalement sur milieu minimal et minimal additionné d'adénine et histidine en vue de dénombrer les colonies prototrophes et auxotrophes respectivement

Dans cette expérience, seul le nombre total de cellules prototrophes est consigné, sans faire de distinction en "grandes" et "petites.

de cellules prototrophes "grandes" double exactement au début, puis décroît. Le décroissement qui suit pourrait être dû soit à un effet toxique, soit à la mutation de la cellule mère. Le tableau 5 montre que l'acriflavine n'a aucune action toxique sur les cellules auxotrophes (qui ne se divisent pas dans ce milieu). Il est vraisemblable que la diminution du nombre de cellules prototrophes "grandes" est dû à une action mutagène sur la cellule mère. Ceci est strictement comparable aux premiers résultats obtenus dans l'étude par micromanipulation du pedigree des cellules en milieu contenant de l'acriflavine (EPHRUSSI et HOTTINGUER, 1951).

TABLEAU N° 5

Incubation d'un mélange de reconstitution (A) ou d'une suspension de cellules diploïdes hétéroalléliques ad3 (B), en milieu minimal contenant de l'acriflavine : Absence de toxicité de cette dernière sur les cellules auxotrophes

TEMPS	NOMBRE DE CELLULES AUXOTROPHES "GRANDES" PAR ml	
	A	B
0 h.	$1,20 \times 10^6$	$1,20 \times 10^6$
9,2 h.	$1,25 \times 10^6$	$1,43 \times 10^6$
11,8 h.	$1,31 \times 10^6$	$1,01 \times 10^6$
23,5 h.	$1,36 \times 10^6$	$1,16 \times 10^6$

Expérience analogue à celle consignée dans la figure 9. Aux différents temps, une dilution adéquate de chaque culture est étalée sur milieu différentiel complet en vue de dénombrer les colonies auxotrophes "grandes" .

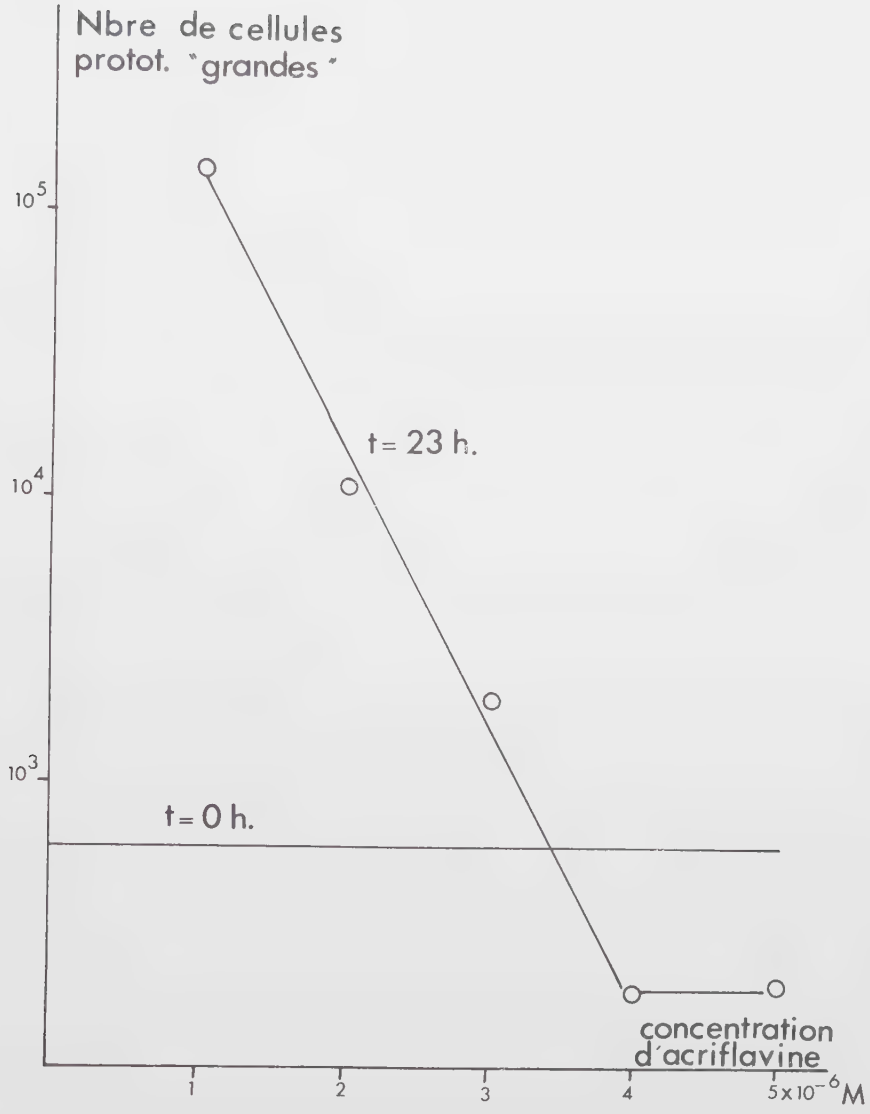


FIGURE 13

Expérience de reconstitution : influence de la concentration d'acriflavine sur son effet mutagène "grande" vers "petite "

Incubation d'un mélange de 0, 68 x 10^6 cellules de la souche auxotrophe LM 56 (ad3-3/ad3-3) et 597 cellules de la souche prototrophe LM 2 (AD3/ad3), en milieu minimal à pH 6, 1, contenant 0, 5 mg/l d'adenine et acriflavine aux concentrations indiquées en abscisse. Aux temps 0 h. et 23 h. une dilution adéquate du mélange est étalée sur milieu différentiel minimal en vue de dénombrer les colonies prototrophes "grandes".

Dans le cas de cellules diploïdes hétéroalléliques ad3 (figure 14, courbe B), le nombre de cellules prototrophes s'accroît très légèrement jusqu'à la treizième heure ; ensuite l'accroissement est plus important et il est linéaire. Cet accroissement de 30 fois que l'on observe est dû essentiellement à l'apparition de nouvelles cellules prototrophes par conversion génique. Même si un bourgeon de chaque cellule prototrophe présente au départ se détachait sans être touché par l'acriflavine, l'accroissement du nombre de cellules prototrophes "grandes" dû à cette dernière cause ne représenterait que 1/30 de l'accroissement total.

L'expérience sur le mélange de reconstitution montre qu'au bout de 20 h. d'incubation on ne retrouve que 70 % de cellules prototrophes de départ. En vue de ce résultat il serait souhaitable de corriger le comptage des cellules prototrophes dans la population de cellules hétéroalléliques. Toutefois, comme l'accroissement du nombre de cellules prototrophes par conversion génique est en absence d'histidine de 2000 % en 20 h, une diminution de 30 % dûe à l'effet mutagène de l'acriflavine sur la cellule mère ne peut que faire sous estimer le nombre de cellules prototrophes "grandes". Cette sous-estimation éventuelle est négligeable devant l'effet massif de l'histidine, comme nous le verrons dans le paragraphe suivant.

En résumé, les conditions optimales ainsi déterminées sont les suivantes : l'incubation est faite en milieu minimal (GO), tamponné à pH 6,1 avec tampon phosphate M/10, additionné d'acriflavine et d'adénine à la concentration finale de 5×10^{-6}M et 0,5 mg/l respectivement. On incube par ml de ce milieu 10^6 cellules de la souche LM 27 (ad3-3/ad3-6), provenant d'une culture en phase logarithmique, et après 20 h. d'incubation les étalements sont faits sur milieu différentiel contenant de l'histidine.

3. Etude de la conversion génique en milieu liquide .

L'étude de la cinétique présentée dans le § D nous a montré que lorsqu'on étale la souche diploïde hétéroallélique ad3, la conversion génique a vraisemblablement lieu avant la 24ème heure. Cet évènement génétique s'exprime ensuite pendant les jours qui suivent, en donnant lieu à un accroissement de colonies prototrophes. Cette situation est extrèmement favorable pour pouvoir étudier l'influence de l'histidine sur la conversion génique au locus ad3 en utilisant le milieu liquide. Le fait que l'évènement génétique ait lieu dans une période aussi courte nous permet d'incuber la population en présence d'acriflavine pendant seulement 20 h., période pendant laquelle l'acriflavine n'a pas un effet mutagène trop prononcé sur la cellule mère.

L'étude de l'inhibition par l'histidine de la conversion génique est réalisée de la façon suivante : la population de cellules diploïdes hétéroalléliques ad3 est incubée dans le milieu avec acriflavine décrit précédemment, en présence ou absence d'histidine, pendant

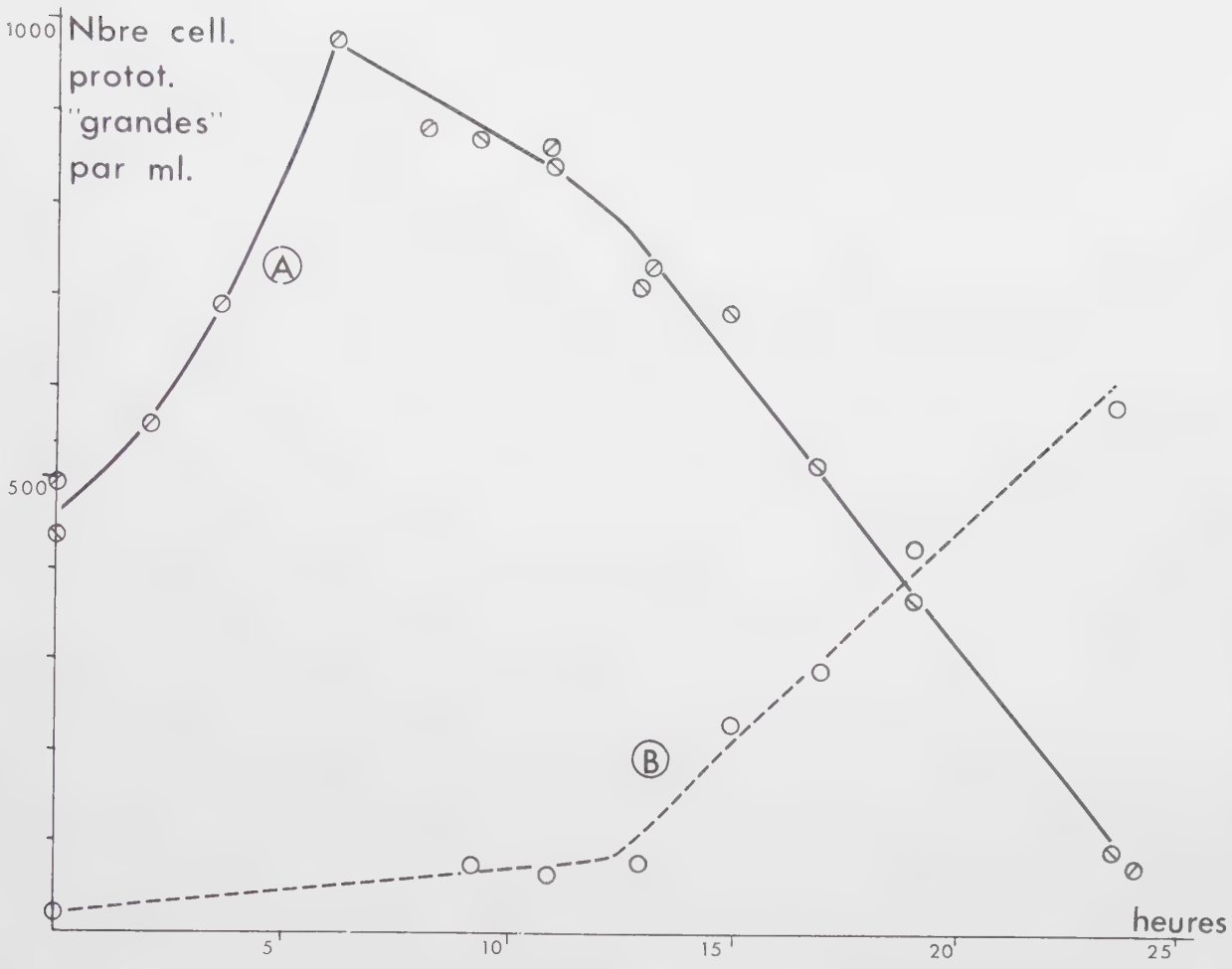


FIGURE 14

Incubation d'un mélange de reconstitution (A) ou d'une suspension de cellules diploides hétéroalléliques ad3 (B) en milieu minimal contenant de l'acriflavine: variation du nombre de cellules prototrophes "grandes" en fonction du temps.

Courbe A : incubation d'environ 10^6 et 500 cellules des souches LM 56 et LM 2 respectivement (expérience analogue à celle consignée dans la figure 13 . Les notations Ø et ⊘ correspondent à deux expériences indépendantes.

Courbe B : incubation d'environ 10^6 cellules de la souche LM 27 (ad3-3/ad3-6).

Milieu d'incubation : minimal, pH 6,1 , contenant de l'adenine (0,5 mg/l) et de l'acriflavine (5×10^{-6}M) .
Aux différents temps, une dilution adéquate de chaque culture est étalée sur milieu différentiel minimal, en vue de dénombrer les colonies prototrophes "grandes" .

20 h. Elle est étalée ensuite sur milieu différentiel synthétique contenant de l'histidine, pour que de nouvelles conversions ne se produisent pas sur boîte. Le plan d'expérience est schématisé dans la figure 15 .

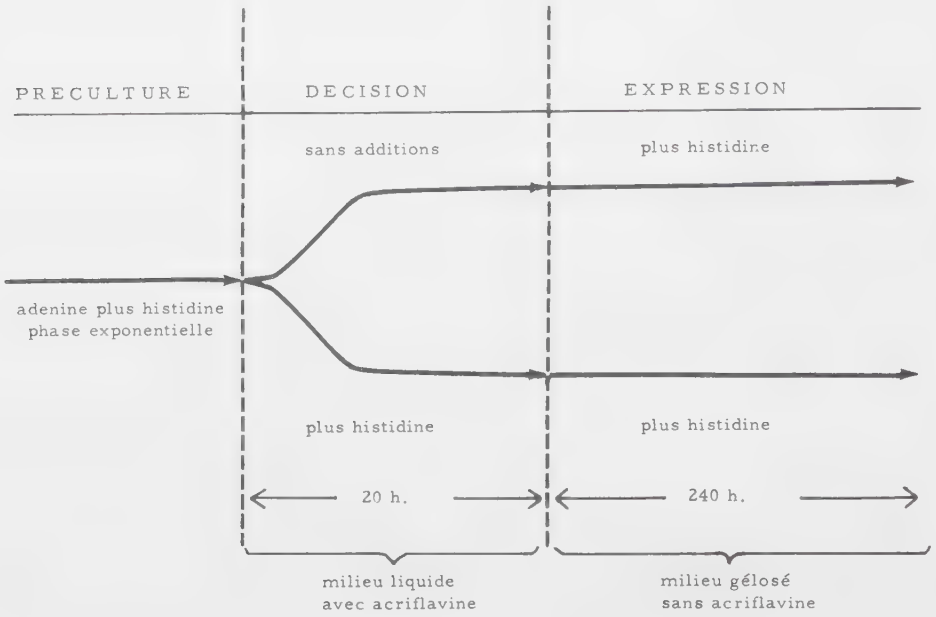


FIGURE 15

Schéma expérimental de l'étude de la conversion génique en milieu liquide .

Ainsi des parties aliquotes de la même préculture sont incubées dans deux milieux qui ne diffèrent que par la présence ou l'absence d'histidine. Toute différence dans le nombre de colonies prototrophes dénombré ultérieurement sur milieu gélosé ne peut être dûe qu'à cette différence pendant la période d'incubation en liquide. Ainsi l'expression du phénomène aura lieu dans des conditions identiques au cours d'une période de temps relativement longue par rapport à la courte période où la décision a eu lieu.

Les résultats de l'expérience sont consignés sur la figure 16.

Après 20 h. d'incubation de la souche diploïde hétéroallélique ad3 (LM 27) en milieu avec acriflavine, le nombre de cellules prototrophes "grandes" s'est accru de 19 fois (courbe BO, figure 16). Cet accroissement continue sur boîte pendant plusieurs jours,

pour arriver à un facteur de 63 au bout de 11 jours. Les résultats de cette expérience sont rigoureusement comparables aux résultats de l'expérience de cinétique faite sur boite (§ D).

La courbe BH indique les résultats de l'addition de l'histidine au milieu liquide. Dans ce cas, le nombre de cellules prototrophes "grandes" s'est accru seulement de deux fois pendant l'incubation en liquide. L'accroissement ultérieur sur boîte est également faible.

La figure 16 montre clairement que l'histidine inhibe la conversion génique. Pour calculer l'ampleur de cette inhibition nous devons tenir compte d'un accroissement de base du nombre de colonies prototrophes. En effet, dans le cas de la population qui n'a pas été incubée en liquide, mais étalée directement au temps 0 sur boîte contenant de l'histidine, il y a accroissement faible mais significatif du nombre de colonies prototrophes (courbe A, figure 16). Nous évaluerons donc l'inhibition par l'histidine de la conversion génique par le rapport entre les accroissements du nombre de colonies prototrophes en absence ou en présence d'histidine dans le milieu liquide, tous deux corrigés de l'accroissement de base que nous avons envisagé. Tous ces accroissements sont mesurés entre le temps 0 et le 4-5ème jour. Cette dernière méthode de calcul, qui sera utilisée dorénavant, donne un chiffre de 93 % dans l'expérience que nous venons de décrire.

Une expérience de ce genre comporte plusieurs autres contrôles. Avant et après la période d'incubation en liquide, des parties aliquotes de la population sont étalées en milieu différentiel synthétique : 1) contenant de l'adénine et de l'histidine en vue de connaître le nombre de cellules auxotrophes "grandes" et "petites"; 2) contenant seulement de l'histidine en vue de connaître le nombre de cellules prototrophes "grandes" et "petites.

Ces comptages permettent de déterminer si l'effet de l'histidine sur la conversion génique ne pourrait être expliqué par un effet banal sur le devenir des différentes classes de cellules, pendant les 20 h d'incubation en liquide. Le tableau 6 résume les résultats de plusieurs expériences de ce type.

Regardons d'abord les cellules auxotrophes "grandes" : leur nombre peut augmenter ou diminuer d'un facteur 2 au maximum. Cette variation est toujours la même que l'histidine soit présente ou non, et elle ne se reflète jamais sur l'ampleur de l'inhibition de la conversion génique. Quant au nombre total de cellules auxotrophes, il s'accroît lors de l'incubation en présence d'histidine, du fait des traces d'adénine présentes, qui permettent une certaine croissance. En effet, 0,5 µg d'adénine, en présence d'histidine, permettent une croissance de 45 µg de poids sec (§II, A) correspondant à 10^6 cellules approximativement . L'accroissement moyen du nombre total de cellules auxotrophes en présence d'histidine est de cet ordre de grandeur : $7,4 \pm 1,9 \times 10^5$ cellules.

Le nombre total de cellules prototrophes s'accroît de 500 fois, que l'histidine

TABLEAU N 6

Etude en milieu liquide de la conversion génique au locus ad3 :
Inhibition par l'histidine

Temps	Zéro		20 h.								4-5 jours			
Type de cellule ou colonie	Auxotrophes totales $\times 10^5$	Prototrophes totales	Auxotrophes " grandes " $\times 10^5$		Auxotrophes totales $\times 10^5$		Prototrophes " grandes "		Prototrophes totales $\times 10^3$		Prototrophes " grandes "			% de l'inhibition de la conversion génique
Incubation en liquide			0	H	0	H	0	H	0	H	Contrôle	0	H	
Expérience P 34	12,8	15	8,5	9,4	9,4	17,4	240	10,5	7,3	4,7	40	697	85	91 %
P 54	15,6	25	11,4	8,2	12,7	21,8	462	23,5	6,2	6,9	148	788	169	99 %
P 57	6,9	4,9	12,2	11,1	12,9	40	300	21,2	3,4	3,7	38,5	698	83	91 %
P 58	7,8	3,6	7,3	6,3	7,6	16,6	390	13	2,6	2,4	33,6	879	69	96 %
P 59	8,7	14,6	9,2	7,6	9,4	13,2	248	26,7	6,2	4,0	38,3	771	93	95 %

Résumé de plusieurs expériences du même type que celle consignée dans la figure 16.
Les valeurs numériques sont exprimées par ml de milieu d'incubation.

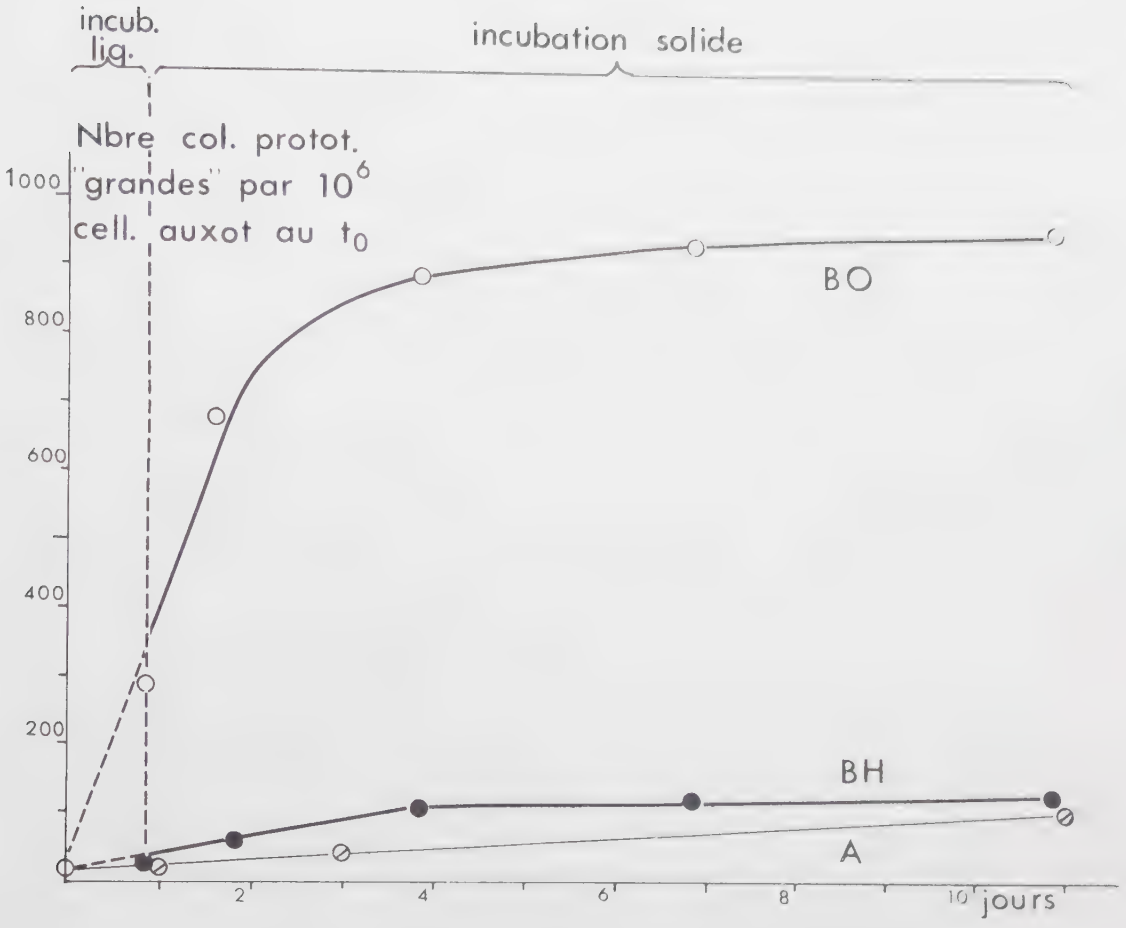


FIGURE 16

Etude en milieu liquide de la conversion génique au locus ad3 : Inhibition par l'histidine

Schéma expérimental consigné dans la figure 15 .

Souche : LM 27 (ad3 – 3 /ad3 – 6) .

Préculture : milieu synthétique contenant adenine et histidine, prélèvement en phase logarithmique.

Incubation en liquide : environ 10^6 cell/ml, pendant 20 h. en milieu minimal , pH 6, 1, adenine 0, 5 mg/l, acriflavine 5 x 10^6 M.

- BO : sans autres additions
- BH : addition de L-histidine à 10 mg/l .

Incubation en solide : après les 20 h. d'incubation en liquide , étalement sur milieu différentiel synthétique contenant de l'histidine (DG16) . A : étalement de la préculture sur DG 16 directement (contrôle).

En ordonnées : nombre de colonies prototrophes "grandes" par 10^6 cellules auxotrophes présentes au temps zéro

En abscisse : Moment du dénombrement des colonies prototrophes, exprimé en jours. Le temps réel est réduit des deux jours nécessaires à une cellule pour donner une colonie visible à l'oeil nu .

soit présente ou non. Ainsi, l'histidine n'inhibe que l'accroissement du nombre de cellules prototrophes "grandes", effet déjà consigné sur la figure 16. L'ampleur de l'inhibition calculée dans ces cinq expériences varie de 93 % à 99 %.

Ces expériences nous permettent d'éliminer des hypothèses assez banales pour expliquer l' "effet histidine".

1) Cet effet pourrait être expliqué par une mortalité différente de la population, en fonction des conditions d'incubation. Imaginons qu'en absence d'histidine les cellules auxotrophes meurent, et que la conversion génique n'ait lieu que chez les cellules mourantes. Ceci rappellerait l'accroissement des mutations chez E. coli 15 T^-, qui meurt en carence de thymine (COUGHLIN et ADELBERG, 1956). L'addition d'histidine, en empêchant la mort, donnerait une inhibition apparente de la conversion génique. Le fait que le nombre total de cellules auxotrophes ne diminue pas systématiquement lors de l'incubation en liquide, nous permet d'exclure toute hypothèse de cette sorte. Ainsi, le calcul de la moyenne des facteurs de viabilité des cellules auxotrophes, pendant les 20 h d'incubation, donne une valeur de $0,9 \pm 0,24$ qui n'est pas significativement différente de 1.

2) Nous avons vu aussi que le nombre total de cellules prototrophes est le même que l'histidine soit présente ou non. Ceci indique que l'histidine n'inhibe pas la croissance des cellules prototrophes une fois formées, mais qu'elle inhibe seulement leur apparition. On ne doit pas s'étonner que la forte différence du nombre de cellules prototrophes "grandes" ne se reflète pas sur la différence du nombre total de cellules prototrophes dans les deux milieux d'incubation. En effet, l'accroissement du nombre de cellules prototrophes "grandes" suit une loi linéaire à partir de la treizième heure (figure 14, courbe B), tandis que l'accroissement du nombre total de cellules prototrophes suit une loi logarithmique depuis le début. Le fait que la croissance des cellules d'une souche prototrophe "établie" n'est pas inhibée par l'histidine, est également montré dans la figure 17, qui représente la croissance de la souche LM 2, en absence d'acriflavine.

Nous venons de voir que l' "effet histidine" ne peut être expliqué ni par une mortalité de cellules auxotrophes, ni par une inhibition de la croissance de cellules prototrophes. Il reste néanmoins une corrélation entre l' "effet histidine" et l'accroissement du nombre total de cellules auxotrophes, qui n'a lieu qu'en présence d'histidine. Cette corrélation est purement fortuite comme nous l'avons déjà vu lors des expériences en milieu gélosé (§ III A, figure 6).

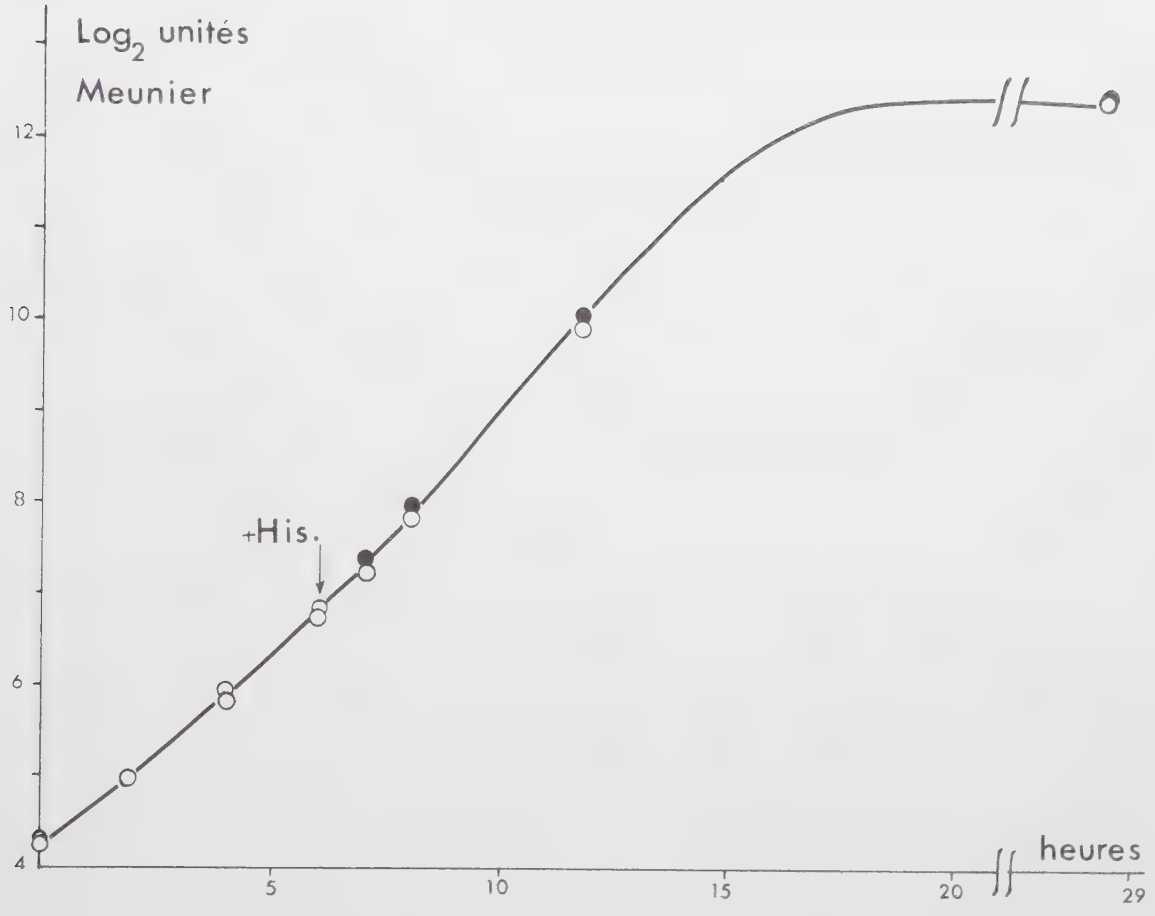


FIGURE 17

Influence de la L-histidine sur la croissance d'une souche prototrophe

Une culture en milieu minimal de la souche LM 2 (AD3/ad3) prototrophe obtenue par conversion génique de la souche LM 27 (ad3-3/ad3-6) est ensemencée parallèlement dans deux milieux de culture identiques (GO). Après 6 h. d'incubation à 28° C, la L-histidine à 10 mg/l est ajoutée à l'un de ces milieux. L'absorbance de deux cultures est mesurée au cours du temps .

4. Action d'analogues structuraux d'acides aminés sur la conversion génique .

Une grande partie du progrès contemporain dans la compréhension de la physiologie cellulaire est dûe à des comparaisons entre les effets des produits dits naturels (isolables à partir de la matière vivante) et les effets d'autres produits de synthèse, chimiquement apparentés. Ces produits sont désignés sous le terme général d'analogues structuraux .

Leur importance vient du fait qu'ils peuvent mimer l'action du produit naturel à tous les niveaux du métabolisme cellulaire. Dans une revue récente, RICHMOND (1962) résume les effets des analogues d'acides aminés sur le métabolisme de microorganismes. Ces effets sont essentiellement de trois types : 1) rétroinhibition de l'activité d'un enzyme d'une chaîne de biosynthèse ; 2) incorporation dans les protéines et 3) répression de la biosynthèse des enzymes de la même chaîne. Ces effets ne sont pas mutuellement exclusifs et leur répercussion sur le métabolisme cellulaire peut être très différente. Bien qu'il soit difficile de généraliser, les deux premiers types d'effet ont pour conséquence soit l'inhibition totale de la croissance, soit le passage d'une croissance logarithmique à une croissance linéaire. Quand l'effet de l'analogue et du troisième type exclusivement (répression), sa répercussion sur la croissance peut être très faible. C'est le cas, par exemple, du 6-méthyltryptophane chez E.coli (LESTER et YANOFSKY, 1961) .

Nous pourrions espérer approfondir la compréhension de l' "effet histidine" en étudiant les effets des analogues de l'histidine sur la conversion génique au locus ad3. Pour cela nous avons pris en considération les substances suivantes : 2-thiazole alanine, 4-thiazole alanine, 1, 2, 4-triazole 3-alanine et pyrazol alanine. Ces composés (aimablement fournis par le Dr AMES) sont rares: nous ne disposions que de quantités minimes - par exemple 0, 5 mg de 2-thiazole alamine. Ainsi l'étude n'a pu être poussée très loin, même en tirant profit du fait que l'incubation en liquide permet d'utiliser des volumes d'incubation très réduits par rapport aux expériences en milieu gélosé. De toutes façons, le petit nombre d'expériences réalisées nous a montré que l'interprétation des résultats n'est pas facile. En effet, parmi ces analogues, ceux qui inhibent la conversion génique, inhibent aussi la croissance des cellules prototrophes. Ceci est une sérieuse limitation lors de l'usage des analogues, car il est difficile de distinguer entre une action directe sur la conversion génique, et une action indirecte et banale dûe à l'inhibition de la croissance.

Les résultats de l'expérience consignée sur la figure 18, partie A, clarifient ces idées. Après 20 h. d'incubation d'une souche diploïde hétéroallélique ad3 (LM 27) en milieu contenant de l'acriflavine et de l'éthionine 10^{-3}M, analogue de la méthionine, le nombre de cellules prototrophes est fortement réduit. Ces résultats sont très semblables à ceux de l'incubation en présence d'histidine. De cela on aurait pu déduire que l'éthionine inhibe la conversion génique au locus ad3, si nous n'avions pas le témoin interne de l'inhibition par l'éthionine de la croissance des cellules prototrophes. En effet on voit dans le tableau 7 (exp.

TABLEAU N° 7

Etude en milieu liquide de la conversion génique au locus ad3

Influence de l'éthionine 10^{-3} M et de la méthionine 10^{-2} M

Temps	Zéro		20 h.												4-5 jours		
	Auxotrophes totales x 10^5	Prototrophes totales	Auxotrophes " grandes " x 10^5			Auxotrophes totales x 10^5			Prototrophes " grandes "			Prototrophes totales x 10^3			Prototrophes " grandes "		
Expériences			0	Eth	Eth +Met	0	Eth	Eth +Met	0	Eth	Eth + Met	0	Eth	Eth +Met	0	Eth	Eth +Met
P54	15,6	25	11,4	5,8	12,9	12,7	6,9	14,2	462	42	1256	6,0	0,2	5,1	788	197	1970
				Met	Met +his		Met	Met +his		Met	Met +his		Met	Met +his		Met	Met +his
P59	8,7	14,6	9,2	5,6	5,0	9,4	5,7	7,2	248	835	27	6,2	4,5	4,7	773	1443	93

Mêmes expériences que celles consignées dans le tableau 6 et la figure I8

P 54 - Inhibition par l'éthionine de la conversion génique et de la croissance de cellules prototrophes . Levée de l'inhibition par la méthionine .

P 59 - Stimulation par la méthionine de la conversion génique et inhibition par l'histidine, même en présence de méthionine.

P54), que l'éthionine provoque une inhibition de 97 % de la croissance des cellules prototrophes L'addition de méthionine 10^{-2}M au même temps que l'éthionine 10^{-3}M, lève l'inhibition par cette dernière de la croissance et de la conversion génique (tableau 7, exp. P54 et figure I8, partie A). On remarquera que la méthionine 10^{-2}M stimule la conversion génique, même quand elle est ajoutée toute seule (tableau 7, exp. P59 et figure I8, partie B). Nous ne savons pas à quoi cette stimulation est dûe. De toute façon, l'histidine inhibe toujours la conversion génique, même en présence de méthionine 10^{-2} M (figure I8, partie B) . En d'autres termes, la méthionine est capable de lever l'inhibition non spécifique de la conversion génique par l'éthionine, mais elle ne lève pas l'inhibition de la même conversion par l'histidine.

Le tableau 8 montre les résultats de plusieurs expériences d'étude de la conversion génique en milieu liquide ou les analogues ont été utilisés. Nous avons consigné seulement l'inhibition de la croissance des cellules prototrophes et de l'accroissement du nombre de colonies prototrophes "grandes". Toute substance qui inhibe la conversion génique, inhibe aussi la croissance, sauf, bien entendu, l'histidine.

Il se dégage de ces expériences que pour l'étude de substances susceptibles d'agir sur la conversion génique, il ne faut pas que le métabolisme cellulaire soit sérieusement perturbé. A moins de trouver un analogue de l'histidine qui n'inhibe pas la croissance cellulaire, tout autre analogue est donc difficilement utilisable.

Ces résultats concordent dans une certaine mesure avec les résultats des expériences en milieu gélosé (§ III, A) où nous avons étudié l'influence sur la conversion génique des traces d'adénine présentes dans l'agar.

Nous venons de conclure que le métabolisme joue un rôle dans la conversion génique. Il est plus facile de vérifier ce rôle en milieu liquide. Par exemple, si on carence en adénine pendant la période d'incubation en liquide, on obtient une diminution de 57 % du nombre de colonies prototrophes "grandes" (figure 19). Du fait que la période de décision est courte par rapport à la période d'expression, la modification du milieu d'incubation en liquide permettrait de changer à volonté tous les paramètres susceptibles de jouer un rôle dans le métabolisme de la cellule.

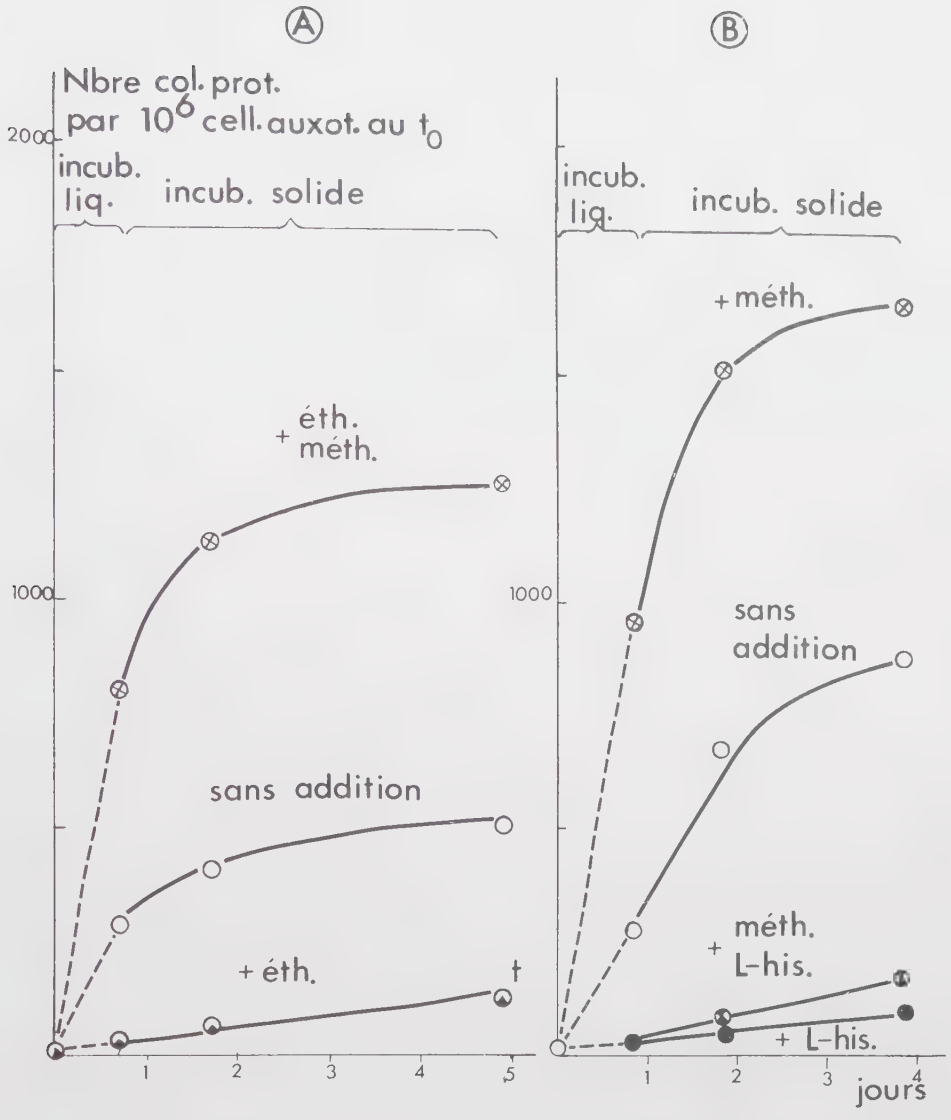


FIGURE 18

Etude en milieu liquide de la conversion génique au locus ad3 :

Influence de l'éthionine 10^{-3}M et de la méthionine 10^{-2} M

Expérience du même type que celle consignée dans la figure I6 . Les substances ajoutées sont présentes pendant les 20 heures d'incubation en liquide.

A : inhibition de la conversion génique par l'éthionine et levée de cette inhibition par la méthionine .

B : stimulation de la conversion génique par la méthionine, et inhibition par l'histidine, même en présence de méthionine.

Concentration des substances ajoutées : Ethionine : 10^{-3} M ;

Methionine : 10^{-2} M ; histidine : 5×10^{-5} M.

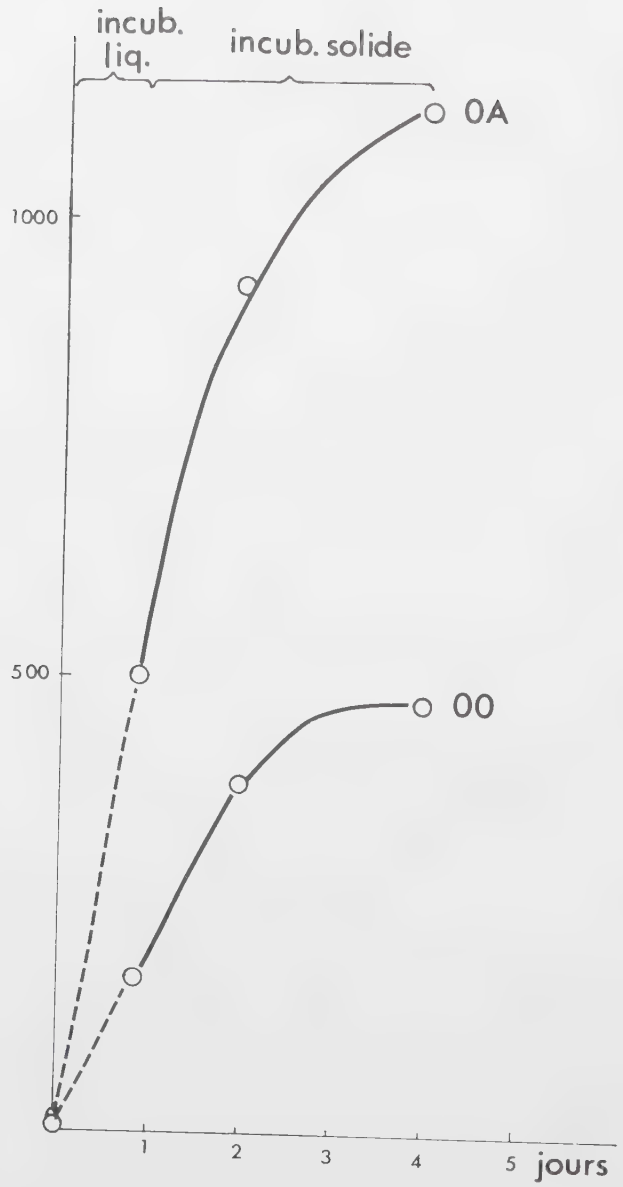


FIGURE 19

Etude en milieu liquide de la conversion génique au locus ad3 : Influence de l'adenine

Expérience du même type que celle consignée dans la figure 16 (mêmes coordonnées) .

OA : milieu habituel d'incubation en liquide, contenant donc 0, 5 mg/l d'adenine .

OO : même milieu ne contenant pas d'adenine.

TABLEAU N° 8

Etude en milieu liquide de la conversion génique au locus ad3 :
Influence des analogues structuraux des acides aminés
comparée à celle de l'histidine

Substances	Concentration	Inhibition de la croissance des cellules prototrophes	Inhibition de l'accroissement total (0-4 j.) du nombre de colonies prototrophes " grandes "	Interprétation sur l'inhibition de la conversion génique
L-Histidine	5×10^{-5} M	12 ± 20 %	95 %	spécifique
		Moyenne des cinq expériences du tableau 6		
Ethionine	10^{-3} M	97 %	92 %	non spécifique
2-thiazole alanine	6×10^{-4} M	93 %	0	pas d'inhibition
3-pyrazole alanine	10^{-3} M	17 %	30 %	sans effet
4-thiazole alanine	$2,5 \times 10^{-3}$ M	99 %	83 %	non spécifique
"	5×10^{-4} M	41 %	26 %	sans effet
triazole alanine	5×10^{-4} M	98 %	84 %	non spécifique
"	10^{-4} M	96 %	54 %	non spécifique
"	10^{-4} M	89 %	3 %	pas d'inhibition

Expériences du même type que celles consignées dans la figure 16. Les analogues structuraux sont présents seulement pendant la période d'incubation en liquide .

IV - DISCUSSION

Au début de ce chapître, nous avons posé la question de savoir si le métabolite final d'une chaîne biosynthétique peut agir sur un phénomène génétique le concernant. Nous allons voir maintenant les conclusions qui se dégagent des expériences décrites.

La croissance de toute cellule implique l'utilisation de l'information contenue dans l'ADN, pour construire un cytoplasme fonctionnel . Le passage de l'information au cytoplasme est réalisée par une série d'étapes : transcription de l'ADN en ARN messager et traduction sur les ribosomes pour donner naissance aux protéines. Ce processus de transcription et traduction a lieu à chaque génération pendant la croissance, pour chaque gène fonctionnel

Dans une cellule auxotrophe, il existe un gène dont l'information soit n'est pas transmise, soit est transcrite en donnant naissance à une protéine non fonctionnelle. Tout passage de l'auxotrophie à la prototrophie nécessite la transcription du nouveau gène en messager nouveau qui doit diriger la formation d'une proteine active absente auparavant. En d'autres termes, le "gène sauvage" nouvellement formé doit s'exprimer dans un cytoplasme dit mutant. La protéine nouvelle une fois formée restaure la croissance en milieu minimal et la cellule peut donner naissance à la colonie visible que nous décelons habituellement.

Le passage de l'auxotrophie à la prototrophie peut donc être résumé en termes de : 1) évènement génétique, 2) transcription, 3) traduction, 4) fonctionnement des protéines et 5) croissance. Le problème que nous abordons ici est de savoir à quelle étape, dans cette série d'évènements, l'histidine pourrait agir pour inhiber l'apparition des colonies prototrophes à partir d'une souche hétéroallélique ad3.

La croissance d'une souche prototrophe "établie" (AD3/ad3) n'est pas inhibée par l'histidine (figure 17). Si l'histidine inhibait une des étapes depuis la transcription du gène AD3 , la cellule manquerait de ce fait de l'adénine, et ne pourrait se multiplier.

Si le passage de l'information de l'ADN "sauvage" au cytoplasme "mutant" est différent du passage de l'information de l'ADN "sauvage" au cytoplasme "sauvage", l'absence d'inhibition de la croissance par l'histidine ne nous renseigne pas sur le cas du prototrophe nouveau né.

La situation peut être éclaircie par une comparaison avec d'autres types de passage de l'auxotrophie à la prototrophie pour le gène ad3 . CLAVILIER (1962) a montré que l'histidine n'inhibe pas l'apparition des colonies prototrophes ni chez une souche diploïde homoallélique ad3 ni chez une souche haploïde ad3 . Dans les deux cas, le gène "sauvage" nouveau né apparu par mutation reverse doit s'exprimer dans un cytoplasme "mutant", qui doit être tout à fait semblable au cytoplasme d'une souche hétéroallélique ad3 . Puisque l'histidine n'inhibe pas la transmission de l'information ni chez un diploïde homoallélique, ni chez un haploïde ad3, il semble peu problable qu'elle puisse l'inhiber chez le diploïde hétéroallélique. La seule étape qui reste alors est l'évènement génétique lui-même, et on peut conclure que l'histidine agit directement au niveau du gène.

Cependant, nous devons ajouter la réserve suivante : l'analyse précédente est basée sur la supposition que la sensibilité à l'histidine de la transmission de l'information à partir des ADN "sauvages" d'origine différente (mutation reverse ou conversion génique) est toujours la même. Il existe néanmoins la possibilité que la transmission de l'information dans un cytoplasme "mutant" soit différente selon l'origine de l'ADN "sauvage". Il nous paraît peu probable néanmoins que deux évènements, mutation reverse et recombinaison intragénique qui restaurent entièrement le phénotype de la cellule, puissent donner naissance à des gènes

de nature extrèmement différente. Ceci est encore moins probable si nous tenons compte du fait que la mutation reverse chez trois souches homoalléliques différentes est insensible à l'histidine tandis que la conversion génique chez les combinaisons hétéroalléliques de mêmes allèles y est sensible.

Malgré le fait qu'une explication basée sur les différences entre les ADN "sauvages" ne puisse être rigoureusement exclue, il nous paraît plus vraisemblable que l'histidine agisse au niveau de l'évènement génétique lui-même.

V - CONCLUSIONS

La conversion génique au locus ad3 est inhibée spécifiquement par la L-histidine. Toute explication basée sur un mécanisme d'action autre que l'inhibition de l'évènement génétique lui-même a été éliminée. Le gène ad3 gouverne les besoins simultanés en adénine et histidine. Nous avons donc ici le premier exemple d'inhibition d'un évènement génétique par le produit final de la chaine biosynthétique qu'il gouverne. Cette inhibition a une spécificité chimique très poussée. Aucune des substances essayées, que ce soit parmi les métabolites naturels ou parmi les analogues structuraux, n'a d'action directe sur la conversion génique. La D-histidine a un comportement particulier : elle n'a pas d'action inhibitrice et au contraire, est capable de lever l'inhibition provoquée par la L-histidine. Cette inhibition a une spécificité génétiquement remarquable car la conversion génique au locus th2 n'est pas inhibée par l'histidine. Par ailleurs, l'histidine n'a aucune action sur la mutation reverse ni du diploïde homoallélique ni de l'haploïde ad3.

Grâce à l'inhibition par l'histidine de la conversion génique au locus ad3 , nous avons pu mettre en évidence que cet évènement génétique n'a vraisemblablement pas lieu avec une probabilité égale au cours du temps, lors de l'étalement de la souche diploïde hétéroallélique sur du milieu minimal. La conversion génique a lieu entre la huitième et la vingt-quatrième heure, et elle s'exprime avec un délai de plusieurs jours. Ce fait, ainsi que l'action particulière de l'acriflavine sur la levure, nous a permis de mettre au point une technique en milieu liquide. Grâce à elle, nous avons pu démontrer sans ambiguïté que la conversion génique au locus ad3 est inhibée par l'histidine. Cette technique ouvre une voie importante dans l'étude de ce genre de phénomènes.

CHAPITRE III

ETUDE DE GENES SUPPRESSEURS DU GENE ad3

I - INTRODUCTION

Nous savons que les souches ad3 présentent deux exigences nutritionnelles. Par ailleurs, nous avons la certitude que leur caractère est dû à la mutation d'un seul gène. En effet, les deux exigences apparaissent à la suite d'un seul évènement mutationnel, (ROMAN 1956a) et sont également perdues simultanément à la suite d'un seul évènement lors de la recombinaison à l'intérieur du gène ad3. De plus, les analyses des tétrades effectuées sur des souches hétérozygotes ad3/AD3 ont montré une ségrégation monogénique : dans chaque tétrade, deux souches exigent l'adénine et l'histidine à la fois et les deux autres sont prototrophes pour les deux exigences.

Cependant, on peut se poser le problème de savoir si la reversion, au sens général, des souches haploïdes ad3, conduit exclusivement à des souches prototrophes à la fois pour l'adénine et l'histidine, comme c'est le cas pour les souches obtenues par conversion génique. La sélection des reversions provenant des souches ad3, peut être faite sur trois milieux, minimal, minimal plus histidine, et minimal plus adénine. S'il s'agit d'une double exigence à détermination monogénique, tout mutant qui croît sur un de ces milieux devrait se développer également sur les deux autres. Nous avons effectivement trouvé quelques souches de ce type ; mais la plupart des souches qui ont été isolées appartiennent à une classe différente et inattendue : elles croissent sur milieu additionné d'adénine et pas sur les deux autres milieux. L'analyse de ces souches a mis en évidence l'existence de gènes suppresseurs qui suppriment l'exigence en histidine des souches ad3. Par contre, nous n'avons pas trouvé de suppresseurs qui suppriment l'exigence en adénine des mêmes souches.

Certains de ces suppresseurs empêchent la conversion génique au locus ad3, nous avons donc pensé qu'il était intéressant d'en faire l'étude systématique.

Les études de la caractéristique de ces gènes suppresseurs et de leur effet sur la conversion génique feront l'objet des deux parties du présent chapître.

II - PREMIERE PARTIE : CARACTERISATION:

A - Milieux utilisés : par souci de simplification, nous appellerons dorénavant : (min) : milieu synthétique contenant de l'uracile; (ade) : (min) additionné d'adénine ; (his) : (min) additionné d'histidine ; (adhi) : (min) additionné d'adénine et d'histidine .

B - Isolement des mutants : Nous avons sélectionné les souches mutées à partir de la souche 02-7, haploïde ad3, (a ur_1 ad3-3) soit par mutation spontanée soit à la suite d'une irradiation par des rayons UV.

Une suspension de 8×10^6 cellules viables de la souche 02-7, irradiée à 100 erg/cm^2 pendant 15 secondes (mortalité 66 %), a été étalée sur (min), sur (his) et sur (ade). Nous avons également étalé 2×10^7 cellules sans irradiation sur les mêmes milieux.

Le tableau 9 résume les résultats. Après irradiation nous avons trouvé 7 colonies sur (ade), une seule sur (his) et aucune sur (min). Sans irradiation, nous avons trouvé deux colonies sur (his). Cependant après huit jours d'incubation, 69 colonies de taille très variable sont apparues sur (ade). Les boîtes sur lesquelles la suspension des cellules irradiées avait été étalée, n'ont pas été examinées au bout de huit jours.

Des cellules provenant de ces colonies ont été prélevées, et leur phénotype vérifié (tableau 10, colonne A). Parmi les 69 colonies apparues sur (ade) au bout de huit jours, seules les 13 premières par ordre de taille ont été étudiées.

Les trois souches apparues sur (his) croissent aussi sur (ade) et sur (min) . Parmi les 13 souches isolées sur (ade), à partir de la suspension non irradiée, deux ont ce même comportement. Ces cinq souches (r10, r18, r19, r1, r2) qui se développent aussi bien milieu minimal que sur milieu supplémenté, donnent une croissante nette au bout de deux jours. Elles ne diffèrent pas d'une souche AD3 : elles peuvent être dûes à une mutation reverse (ad3 vers AD3) .

Le phénotype des autres souches isolées, apparues sur (ade) est moins clair. Elles croissent toutes lentement ; un développement confluent n'est observable qu'après 4-5 jours d'ensemencement d'une goutte sur une boîte de Pétri . Les tests en gouttes ne permettent pas une description détaillée du phénotype. Toutefois il paraît exister plusieurs catégories de souches :

1) celles qui croissent sur (ade) seulement (p. ex. : O2-7 r3),
2) celles qui croissent aussi sur (his), mais moins bien que sur (ade) (p. ex. : 02-7 r14),
3) celles qui croissent mal sur les deux milieux (p. ex. : 02-7 r11),
4) enfin celles qui croissent mal sur (ade), pas du tout sur (his) mais aussi mal sur

(adhi) que sur (ade) (p. ex. : 02-7 r6).

Ces quatre catégories ne recouvrent pas l'ensemble des phénotypes observés. Remarquons que toutes les souches capables de croître sur (his) se développent encore mieux sur (ade). Aucune des souches qui présente une croissance lente sur (ade) et (his) ne se développe sur (min).

Toutes les souches décrites dans le tableau 10 ont été croisées avec la même souche ad3-3 et le phénotype du diploïde résultant a été déterminé . Ce test classique permet de préciser la dominance des gènes mutés.

TABLEAU N° 9

Nombre de colonies apparues sur boîte de Pétri lors de l'étalement d'une souche haploïde ad3

Traitement de la Suspension cellulaire	Irradiation UV			Sans irradiation		
Milieu d'étalement	(min)	(ade)	(his)	(min)	(ade)	(his)
Nombre de colonies visibles après :						
5 j.	0	7	1	0	0	2
8 j.	-	-	-	0	69	2

Souche utilisée : 02 - 7 (ad3-3 ur1)

Milieux d'étalement : (min) : synthétique contenant de l'uracile
(ade) : (min) plus adénine
(his) : (min) plus histidine

Suspension irradiée : 8×10^6 cellules viables de la souche 02-7 irradiée à 100 erg/cm^2 pendant 15 sec. (mortalité 66 %), sont étalées sur les milieux consignés plus haut.

Suspension non irradiée : 2×10^7 cellules viables de la souche non irradiée sont étalées sur les mêmes milieux.

TABLEAU N° 10

Phénotype et dominance des mutants isolés

Nomenclature des mutants	Origine des mutants		Colonne A Phénotype des mutants				Colonne B Phénotype des souches diploïdes mutant x ad3-3 ou test de dominance			
	Traitement	Milieu de sélection	Croissance dans les différents milieux				Croissance dans les différents milieux			
			(min)	(ade)	(his)	(adhi)	(min)	(ade)	(his)	(adhi)
02 - 7	—	—	—	—	—	++	—	—	—	++
02 — 7 r3	UV	ade	—	++	—	++	—	+	—	++
r4	"	"	—	++	—	++	—	+	—	++
r5	"	"	—	++	—	++	—	+	—	++
r6	"	"	—	+	—	+	—	+	—	++
r7	"	"	—	+	+	+	—	+	—	++
r8	"	"	—	+	—	+	—	+	—	++
r9	"	"	—	++	—	++	—	+	—	++
r10	" sans irradiation	his	++	++	++	++	++	++	++	++
r11	"	ade	—	±	±	++	—	—	—	++
r12	"	"	—	+	—	+	—	—	—	++
r13	"	"	—	±	±	++	—	—	—	++
r14	"	"	—	++	+	++	—	—	—	++
r15	"	"	—	+	—	++	—	—	—	++
r16	"	"	—	+	±	++	—	—	—	++
r17	"	"	—	+	±	++	—	—	—	++
r20	"	"	—	++	±	++	—	—	—	++
r21	"	"	—	+	—	+	—	—	—	++
r22	"	"	—	+	—	+	—	—	—	++
r23	"	"	—	±	—	++	—	—	—	++
r18	"	"	++	++	++	++	++	++	++	++
r19	"	"	++	++	++	++	++	++	++	++
r1	"	his	++	++	++	++	++	++	++	++
r2	"	"	++	++	++	++	++	++	++	++

Colonne A : Chaque souche haploïde est cultivée en YPGA pendant 48 h. Une goutte de cette culture est diluée dans 10 cc. de solution d'eau physiologique , et une goutte de cette dilution est ensemencée sur les milieux gelosés utilisés dans l'expérience consignée dans le tableau 9, et le milieu synthétique complet (adhi) : (min) plus adenine et histidine . La croissance est observée après 4 jours d'incubation à 28° C .

Colonne B : Chaque souche est croisée avec la même souche ad3-3 (23-22 : ad3-3th2) , le diploïde isolé sur milieu contenant adenine et histidine. Chaque souche diploïde est cultivée et son phénotype déterminé , dans les mêmes conditions que celles consignées pour les souches haploïdes (colonne A) .

Le tableau 10,(colonne B), résume les résultats. Tous les diploïdes obtenus par croisement des mutants spontanés (ade$^-$his$^+$) exigent l'adénine et l'histidine, ce qui signifie que les mutations sont récessives. Les diploïdes obtenus par croisement des mutants isolés après irradiation, croissent en général plus lentement que l'haploïde correspondant sur (ade). Malgré cela, le fait qu'une souche ad3-3/ad3-3 ne croît pas sur milieu autre que (adhi) nous permet de considérer que les mutations apparues après irradiation sont dominantes. La mutation des souches dont le phénotype est ade$^+$ his$^+$ (r10, r18, r19, r1 et r2) est dominante, comme on doit s'y attendre si l'évènement à l'origine de ces souches est une mutation reverse.

C - Génétique des mutants isolés .

Le phénotype ade$^-$his$^+$ des souches étudiées peut être dû soit à une mutation du gène ad3 lui-même, soit à celle d'un suppresseur distinct génétiquement.

Nous pouvons distinguer entre les deux possibilités, en croisant les mutants ade$^-$his$^+$ avec une souche sauvage, et en faisant l'analyse de tétrades du diploïde qui en résulte.

Le principe de l'analyse de tétrades est le suivant : considérons deux couples de gènes a/A et b/B et deux souches de levure de signes opposés, une possédant le génome ab, l'autre le génome AB. Le diploïde formé par le croisement des deux souches aura le génome a/A b/B, et la méiose conduit à trois types d'asques (tétrades) :

Ier type : il n'y a que deux génotypes qui sont identiques à ceux des parents (ab et AB). Ces tétrades sont ditypes parentales, représentées par le symbole DP.

2ème type : il n'y a que deux génotypes qui sont obtenus par recombinaison (aB et Ab) Ces tétrades sont ditypes recombinées, représentées par le symbole DR.

3ème type : il y a quatre génotypes différents, deux identiques à ceux des parents (ab et AB) et deux résultant de recombinaison (aB et Ab). Ces tétrades sont tétratype, représentées par le symbole TT.

Dans le cas envisagé on doit pouvoir distinguer entre deux possibilités. Si le phénotype ade$^-$his$^+$ est dû à une mutation du gène ad3 lui-même, la sporulation du diploïde formé entre le mutant et la souche sauvage ne donnera que des tétrades ditypes parentales. Les quatre spores d'une tétrade donneront naissance à des souches his$^+$, et la recombinaison ade$^-$his$^-$ n'existera pas. Si le phénotype ade$^-$his$^+$ est dû à l'association du gène ad3 avec un gène suppresseur s-hi, le génotype du diploïde sera ad3/AD3 s-hi/s$^+$-hi. Au cours de la méiose ce diploide donnera naissance aux trois types de tétrades cités plus haut.

Le génotype et le phénotype attendus des souches issues de ces tétrades sont résumées dans le tableau 11. On constate que les spores recombinées ont deux génotypes

ad3 s^+-hi ou AD3 s-hi. Les souches de génotype ADS_3s-hi auront le même phénotype (ade^+his^+) que les souches de génotype AD3 s^+-hi, si le suppresseur n'a d'action que dans un génome ad3. De ce fait nous ne pouvons déceler que la moitié des recombinants. L'existence de recombinants ade^-his^- est d'ailleurs suffisante pour montrer l'existence des suppresseurs.

T A B L E A U N° 11

Types de tétrades attendus lors de la sporulation

d'une souche diploïde de génotype ad3/AD3 $s_{hi}/\frac{s^+}{}_{hi}$

Type de tétrade	Génotypes des spores	Phénotype des souches issues des spores
Ditypes parentales	ad3 s_{hi}	ade^- his^+
DP	ad3 s_{hi}	ade^- his^+
	AD3 s^+_{hi}	ade^+ his^+
	AD3 s^+_{hi}	ade^+ his^+
Ditypes recombinées	ad3 s^+_{hi}	ade^- his^-
DR	ad3 s^+_{hi}	ade^- his^-
	AD3 s_{hi}	ade^+ his^+
	AD3 s_{hi}	ade^+ his^+
Tétratypes	ad3 s_{hi}	ade^- his^+
	ad3 s^+_{hi}	ade^- his^-
	AD3 s^+_{hi}	ade^+ his^+
	AD3 s_{hi}	ade^+ his^+

TABLEAU N° 12

Analyse de tétrades des croisements des quelques mutants issus des reversions de la souche ad3-3 (02-7) avec la même souche AD3 (39-2C)

Souche parentale	Phénotype	Nbre de tétrades	types de tétrades			Interprétation	Nomenclature
			DP	TT	DR		
02-7 r10	ade^{+} his^{+}	3	3	0	0	mutation reverse	AD3
r18	ade^{+} his^{+}	3	3	0	0	" "	"
r 5	ade^{-} his^{+}	5	0	3	2	mero-suppresseur non lié	S5 -hi
r 9	ade^{-} his^{+}	6	1	4	1	" "	S9 -hi
r14	$ade^{\pm}$ his^{+}	11	0	6	5	" "	s14-hi
r15	ade^{-} $his^{\pm}$	7	0	6	1	" "	s15-hi
r17	$ade^{\pm}$ $his^{\pm}$	5	0	3	2	" "	s17-hi
r21	ade^{-} $his^{\pm}$	10	4	4	2	" "	s21-hi
r7	$ade^{\pm}$ $his^{\pm}$	61	58	3	0	mero-suppresseur lié	S7

Les résultats des analyses de tétrades des croisements des quelques mutants avec la même souche AD3 (39-6D), sont résumés dans le tableau 12. Les conclusions qui s'en dégagent sont les suivantes :

a) les diploïdes obtenus à partir des mutants de phénotype $ade^{+}his^{+}$ (r10 et r18) donnent naissance à des tétrades ditypes parentales seulement. Toutes les souches issues des spores ont le phénotype $ade^{+}his^{+}$ qui est net dès le deuxième jour après la replique. Ce résultat est en accord avec la conclusion résultant de l'étude du phénotype des mêmes mutants et du test de dominance : les mutations ($ade^{+}his^{+}$) pourraient être dûes à une mutation reverse ad3 → AD3 . Cependant, le faible nombre de tétrades analysées ne nous permet pas de le démontrer définitivement. Si la mutation était due à un gène suppresseur dominant qui restaurerait entièrement le phénotype ad3, nous pourrions calculer à quelle distance maximale du locus ad3 se trouverait ce gène suppresseur, en admettant, par exemple, 5 % de risque. Cette distance serait de 50 UCO qui correspondent à une probabilité de DP de 0, 37 pour chaque tétrade (PREVOST, 1962). Trois tétrades étant trois tirages indépendants, la probabilité de trouver 3DP est $(0, 37)^3 = 0, 05$. Nous pouvons donc exclure la possibilité que ce gène suppresseur soit entièrement indépendant de ad3, car dans ce cas la probabilité de trouver une tétrade DP à chaque tirage serait 1/6 (ad3 n'étant pas lié au centromètre) et la possibilité de trouver

trois tétrades DP serait $(1/6)^3 = 0,005$; mais nous ne pouvons pas exclure que le gène suppresseur soit faiblement lié à ad3. Il est évident que pour démontrer qu'une reversion n'est pas dûe à une mutation reverse il faudrait faire une analyse portant sur un nombre très important de spores.

b) Par contre l'analyse d'un nombre faible de tétrades peut être très utile lorsqu'on veut démontrer qu'une réversion est dûe à deux gènes non fortement liés. Si l'on veut exclure que les deux gènes sont liés à moins de 5 % de recombinaison, le fait de trouver une seule tétrade DR est suffisant, car il faut deux crossing-over pour obtenir une tétrade de cette sorte. Dans la deuxième classe des mutants consignés dans le tableau 12 nous retrouvons des DR.

Ceci nous indique la présence d'un gène suppresseur non fortement lié à ad3. Ces suppresseurs ne sont pas tout à fait du type habituel. Un suppresseur de type habituel est un gène qui restaure partiellement ou totalement le phénotype d'une souche mutée à un autre locus. Par exemple, un suppresseur habituel ad3 permettrait la croissance plus ou moins rapide de la souche en milieu minimal. Nous n'avons jamais trouvé ce type de suppresseur. Toutes les souches de phénotype ade^+his^+ que nous avons trouvées sont fort probablement de génotype AD3. Le seul type de suppresseur qui se manifeste, supprime seulement l'exigence en histidine. Nous pourrions définir une nouvelle classe de suppresseurs, restaurant qualitativement une partie du phénotype d'une mutation pléiotrope. Nous suggérons le terme de mero-suppresseurs.

c) Le cas de la souche 02-7 r7 est particulier. L'analyse de 61 tétrades a donné 3 TT avec des spores ade^-his^- (tableau 12). On aurait donc pu conclure à un mero-suppresseur lié à 2,5 % de recombinaison. En fait, lorsque nous avons repris les souches issues de ces spores pour vérifier leur génotype, par un croisement approprié, le phénotype his^- qui leur avait été attribué s'est avéré essentiellement variable : les souches présumées his^- sont devenues his^+. Ainsi aucun recombinant stable ade^-his^- n'a pu être mis en évidence dans notre analyse. Rien ne s'oppose donc à considérer la souche 02-7 r7 comme issue d'un évènement mutationnel au locus ad3 lui-même : soit un changement au site même (mutation reverse partielle) soit à un autre site dans le locus (mero-suppresseur "intragénique").

Ce phénotype variable a été constaté pendant l'étude concernant tous les suppresseurs. Il nous a été très difficile d'assigner un phénotype net aux différentes souches, et cette difficulté s'est accrue lors de l'analyse de tétrades, où le phénotype est déterminé par la technique de répliques. Ainsi l'étude de la ségrégation de différents suppresseurs, - par l'analyse de tétrades des souches diploïdes homoalléliques pour ad3-3 et hétérozygotes pour un suppresseur, - n'a pas donné des résultats entièrement satisfaisants. Nous avons rencontré une déviation de la ségrégation monogénique attendue, qui peut être attribuée aussi

à la difficulté de préciser le phénotype des souches issues des spores.

Des souches semblables à la souche 02-7 r7 (mero-suppresseur "intragénique") ont été rencontrées par hasard lors de notre étude sur la conversion génique. La souche 4041C (en provenance du laboratoire de ROMAN) décrite comme ayant le génotype ad3-9 ur_1, appartient à ce type de mutants : son phénotype est ade^-his^+. Lors du croisement avec une souche AD3, dix tétrades analysées n'ont donné que des ditypes parentales, $\left[2\ (ade^-his^+) : 2\ (ade^+his^+)\right]$. D'autres souches ont été isolées par CLAVILIER de la façon suivante : une souche diploide prototrophe obtenue par conversion génique d'une souche ad3-3/ad3-6, a été soumise à l'analyse de tétrades. Parmi les souches issues des spores, quelques unes présentaient le phénotype $ade^-\ his^+$. Le test d'hétéroallélisme appliqué au gène ad3 de ces souches a montré qu'il s'agissait d'un hétéroallèle différent d'ad3-3 et d'ad3-6 : nous l'avons appelé ad3-20. La généalogie de ces souches n'a jamais été éclaircie. La mutation du phénomène ade^-his^+ est dominante.

Une de ces souches ad3-20 (04-9g) a été croisée avec une souche AD3, et le diploïde soumis à l'analyse de tétrades. Le fait que les 13 tétrades analysées étaient toutes de ditype parental, comme il a été discuté plus haut, nous indique l'existence soit d'un mero-suppresseur "intragénique" (que nous appellerons S24), soit d'une mutation reverse partielle.

D - Détermination de l'allélisme des suppresseurs.

Nous avons isolé 11 mutants spontanés (récessifs), et 7 mutants après irradiation (dominants). Nous avons vu que ces mutations sont dûes à des mero-suppresseurs non fortement liés à ad3, ou a des mero-suppresseurs "intragéniques". Toutefois, nous ne savons pas à combien de loci génétiques correspondent ces mero-suppresseurs.

Le test d'allélisme permet de déterminer si deux mutations ayant le même phénotype sont dûes à des gènes allèles. Quand les deux gènes en cause sont récessifs, on peut réaliser le test phénotypique d'allélisme. Par contre, quand l'un ou les deux gènes considérés sont dominants, le diploïde aura toujours le phénotype mutant, et il faut alors réaliser un test génotypique d'allélisme.

Nous avons effectué le test phénotypique d'allélisme pour trois mutants récessifs, 02-7 r14, r17 et r21. Après obtention des souches de signes rendant possible les croisements, nous avons constitué tous les diploïdes possibles entre les trois mutants. Leurs phénotypes ont été déterminés par la technique utilisée lors de l'analyse de tétrades.: une plage de chaque culture a été ensemencée sur une boîte de Pétri contenant de l'YPGA, et après deux jours d'incubation, la boîte a été repliquée sur les différents milieux synthétiques convenables. Dans le but de confirmer la nature diploïde des souches, nous avons aussi déterminé leur capacité de copulation avec deux souches haploïdes de signes opposés.

Toutes les souches dont le phénotype est consigné dans le tableau 13 sont des diploïdes.

Le fait que tous les diploides aient le phénotype his^+ suggère que les suppresseurs s14-hi, s17-hi et s21-hi sont allèles.

Nous avons étudié aussi l'allélisme entre le mero-suppresseur dominant S9-hi et le mero-suppresseur récessif s15-hi, par un test génotype d'allélisme. Nous avons construit un diploïde $\frac{ad3\text{-}3}{ad3\text{-}3}\ \frac{s15\text{-}hi}{+}\ \frac{+}{S9\text{-}hi}$ entre une souche dérivée de 02-7 r9 et la souche 02-7 r15. Ce diploïde a été soumis à l'analyse de tétrades et parmi les 10 tétrades analysées, nous avons retrouvé 3DP (4 ade^-his^-), 4 TT (3 ade^-his^- : 1 ade^-his^+) et 3DR (2 ade^-his^- : 2 ade^-his^+). Cette ségrégation suggère que les mero-suppresseurs dominant et récessifs étudiés ne sont pas allèles.

TABLEAU N° 13

Test phénotypique d'allélisme entre les souches portant les mero-suppresseurs récessifs s14-hi, s17-hi et s21-hi

Nomenclature			94 - 3B	95 - 4D	96 - 2B
	Génotype		a ad3-3 s14-hi	a ad3-3 s17-hi	a ad3-3 s21-hi
		Phénotype	$ade^{\pm}$ his^+	$ade^{\pm}$ his^+	ade^- his^+
94-4C	ad3-3 s14-hi	$ade^{\pm}$ his^+	$ade^{\pm}$ his^+	----	ade^- his^+
95-3A	ad3-3 s17-hi	$ade^{\pm}$ his^+	$ade^{\pm}$ his^+	$ade^{\pm}$ his^+	ade^- his^+
96-2C	ad3-3 s21-hi	ade^- his^+	ade^- his^+	----	ade^- his^+

Les souches haploïdes dont le nom, le génotype et le phénotype sont indiqués sur le tableau, sont croisées deux à deux . Chaque souche diploïde est obtenue par isolement des zygotes ou micro-manipulateurs et leur phénotype , consigné à l'intérieur de chaque case , est déterminé par la technique des répliques. Les souches haploïdes proviennent des tétrades obtenues lors de la sporulation des souches diploïdes suivantes :

AD3 (39-2C) x ad3-3 s14-hi (02-7 r14)
" x ad3-3 s17-hi (02-7 r17)
" x ad3-3 s21-hi (02-7 r21)

Du fait que nous n'avons pas étudié toutes les souches ade$^-$ his$^+$ nous ne pouvons pas préciser dans combien de loci différents sont distribués les mero-suppresseurs. Toutefois, trois des mero-suppresseurs récessifs étudiés seraient allèles et un autre mero-suppresseur récessif ne serait pas allèle d'un mero-suppresseur dominant. Nous avons déjà montré que ces mero-suppresseurs ne sont pas liés à ad3 . Il est vraisemblable que les mero-suppresseurs sont distribués dans au moins trois loci différents : un pour le mero-suppresseur récessif (s15-hi), un pour le mero-suppresseur dominant (S9-hi) et un pour le mero-suppresseur lié à ad3 (S7-hi).

E. Conclusions de la première partie .

Au cours de la recherche des reversions du gène ad3 , nous avons mis en évidence l'existence de gènes suppresseurs d'un type particulier. Leur effet est une restauration partielle du phénotype his$^+$ chez les souches ad3, qui normalement présentent les exigences simultanées en adénine et histidine. Nous leur avons donné le nom de mero-suppresseurs :

Du point de vue de la localisation sur le chromosome, les mero-suppresseurs décrits se classent en trois catégories au moins :

1) Mero-suppresseurs récessifs non liés à ad3,
2) Mero-suppresseurs dominants non liés à ad3,
3) Mero-suppresseurs dominants "intragéniques" ou fortement liés à ad3 .

Cette dernière catégorie n'appartient peut-être pas à la classe des mero-suppresseurs, car à l'heure actuelle, nous ne pouvons pas la différencier d'une mutation reverse partielle. Il existe, néanmoins, un moyen expérimental de choisir entre ces possibilités. Jusqu'à présent, la mutation se trouve associée à un allèle d'ad3 , soit ad3-9, soit ad3-20. On pourrait espérer dissocier les deux mutations par recombinaison au cours de la sporulation d'une souche hétérozygote pour le mutant ade$^-$his$^+$. (p. ex. : $\frac{\text{ad3-3 S7-hi}}{+}$). Il faudrait déceler les rares recombinants ade$^-$his$^-$ parmi un nombre important de spores, à l'aide de la technique de repliques.

Du point de vue du phénotype que ces mero-suppresseurs confèrent à la souche ad3 , une classification est difficile, surtout parce que les phénotypes ont été étudiés sur du milieu gélosé. Il faudrait approfondir leur étude par la détermination des paramètres de croissance avant d'en faire une classification. Cette étude n'a été réalisée que pour un mero-suppresseur récessif. La figure 20A montre la croissance d'une souche ade$^-$his$^+$, ad3-3 s21-hi (96-2C). Nous voyons que la souche croît en milieu contenant de l'adénine seule avec un taux égal à 48 % du taux de croissance de la même souche en milieu contenant de l'adénine et de l'histidine (taux de 0,17 h^{-1} par rapport à 0,4 h^{-1}). La figure 20B montre la croissance d'une souche ad3, sans suppresseur, dans les mêmes conditions : en milieu contenant de l'adénine

seule, elle réalise moins d'un tiers de divisions en 30 heures.

Une souche portant un suppresseur, même si elle croît en milieu contenant [illegible] pousse mieux dans le même milieu contenant aussi de l'histidine. En d'autres termes, les mero-suppresseurs rendent les souches ad3 auxotrophes pour l'adénine et bradytrophes pour l'histidine.

Nous n'avons pas trouvé de suppresseurs qui rendent la souche ad3 auxotrophe pour l'histidine et bradytrophe pour l'adénine. Par ailleurs, on ne connaît pas de suppresseurs non liés à ad3 qui rendent les souches ad3 bradytrophes ou prototrophes pour l'adénine et l'histidine à la fois, c'est-à-dire qui croîtraient plus ou moins bien en [illegible]. Toutes les mutations de phénotype $ade^+ his^+$ analysées, pourraient être considérées comme des mutations reverses.

Chez la levure, KAKAR, ZIMMERMAN et WAGNER (1964), ont mis en évidence des suppresseurs présentant une certaine analogie avec les mero-suppresseurs de ad3. La souche M12 a un besoin simultané en isoleucine et valine, à la suite d'un seul évènement mutationnel. Ces auteurs ont isolé à partir de cette souche, des mutants n'exigeant plus que la valine, mais pas de mutants n'ayant besoin que d'isoleucine. La restauration de la prototrophie pour l'isoleucine est dûe à un gène suppresseur non lié. Pour d'autres gènes de structure conduisant à la même double exigence, ils ont trouvé la situation réciproque, à savoir des souches n'ayant plus besoin que d'isoleucine, mais pas de souches exigeant seulement la valine. L'analyse génétique de cette dernière classe de mutants n'a malheureusement pu être faite.

D'autres études concernant des suppresseurs chez la levure ont été réalisées

PARK et DOUGLAS (1957) ont décrit un suppresseur du locus tr_1 qui rend la souche bradytrophe pour le tryptophane. Cette situation est la plus courante chez la levure et les microorganismes en général ; un suppresseur ne restaure que partiellement le phénotype sauvage d'une mutation donnée. Par contre, KAKAR (1963b) a mis en évidence des suppresseurs du locus is_1 (isoleucine), tous dominants, qui non seulement restaurent entièrement le phénotype sauvage, mais qui provoquent de plus une stimulation de la croissance : la croissance maximale d'une souche suppressée en absence d'isoleucine est meilleure que celle d'une souche non suppressée en milieu contenant de l'isoleucine. HAWTHORNE et MORTIMER (1963) ont décrit des suppresseurs d'un type encore différent. Ce sont les super-suppresseurs, qui restaurent le phénotype sauvage de plusieurs mutations à la fois concernant des loci différents.

A l'heure actuelle l'étude des suppresseurs est un problème très important et plusieurs chercheurs essaient de mettre à l'épreuve un certain nombre d'hypothèses qui ont été émises pour expliquer leur action. Une mise au point récente a été faite par BENNETT et DREYER (1964).

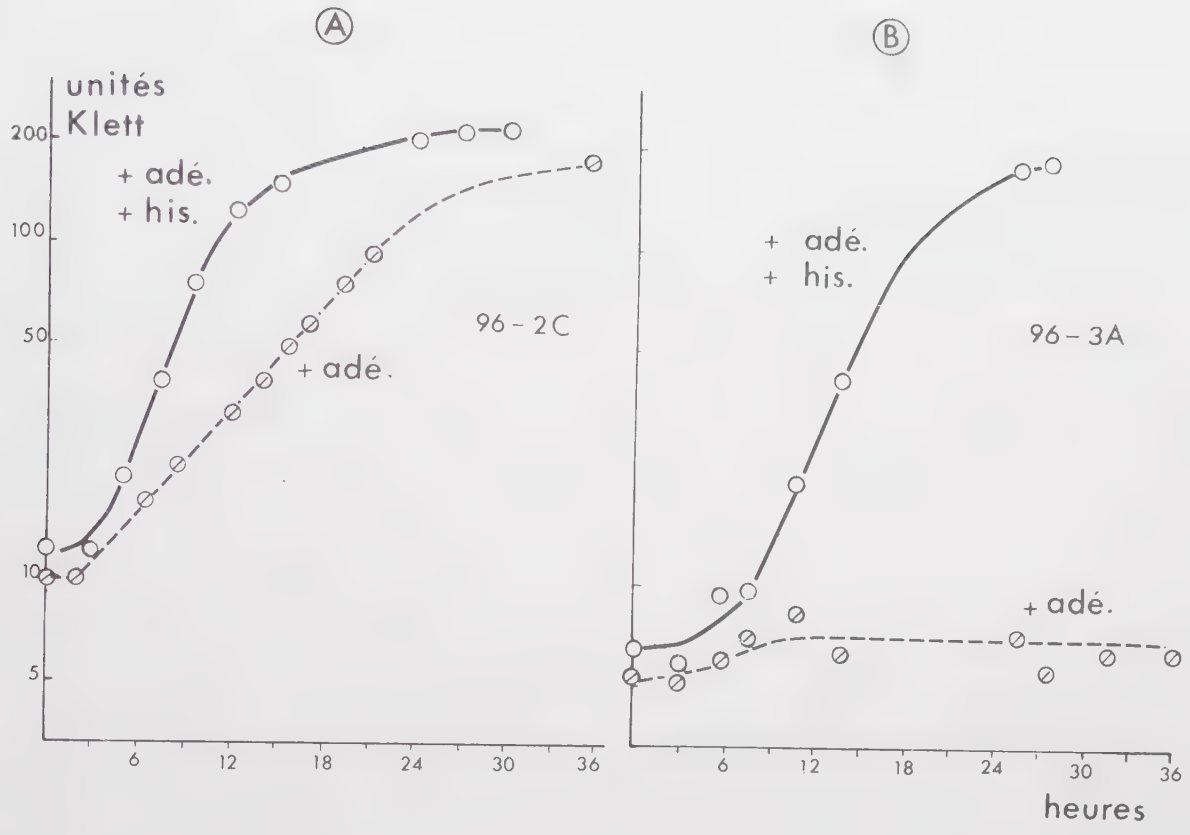


FIGURE 20

Courbes de croissance des souches haploïdes ad3-3 s_{21}-hi et ad3-3

Souches : A : 96-2C (ad3-3 s_{21}-hi m_1) provenant d'une tétrade obtenue lors de la sporulation du diploïde 02-7 r21 x 39-2C.

B : 96-3A (ad3-3 me_1) , provenant d'une autre tétrade du même croisement.

Préculture : milieu synthétique contenant de l'adenine (20 mg/l) de l'histidine (10 mg/l) et de la méthionine (20 mg/l) . Une partie aliquote de la préculture est ensemencée en milieu synthétique contenant de la méthionine.

plus adenine : trait pointillé

plus adenine et histidine : trait plein.

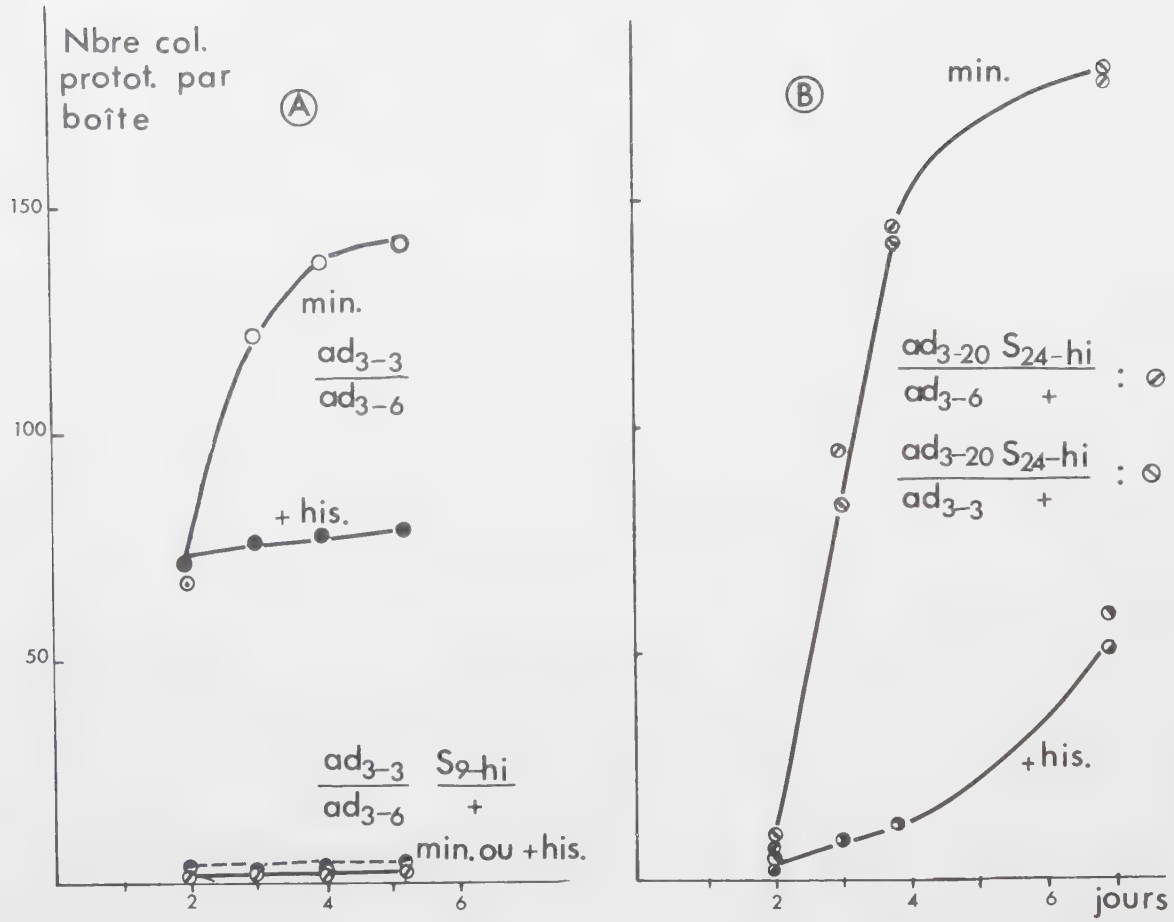


FIGURE 21

Accroissement du nombre de colonies prototrophes au cours du temps lors de l'étalement de différentes souches en milieu minimal additionné ou non d'histidine

Souches cultivées en YPGA.

A : étalement de :

500 000 cellules de la souche de génotype ad3-3/ad3-6 (LM 59)

267 000 cellules de la souche de génotype ad3-3/ad3-6 S_9-hi / + (LM 80)

B : étalement de :

150 000 cellules de la souche de génotype ad3-20 S_{24}hi/ad3-6 + (LM 57)

120 000 cellules de la souche de génotype ad3-20 S_{24}hi/ad3-3 +)LM 58)

Le mécanisme d'action des mero-suppresseurs du gène ad3, sera discuté plus loin.

III - DEUXIEME PARTIE - ACTION DES GENES SUPPRESSEURS SUR LA CONVERSION GENIQUE .

A - Inhibition de la conversion génique par des gènes suppresseurs.

La présence d'un mero-suppresseur dans le génome d'une souche ad3 permet à la souche de croître en absence d'histidine exogène. Il est donc évident que la souche portant un suppresseur est capable de synthétiser une certaine quantité d'histidine.

Par ailleurs, nous savons que l'histidine ajoutée au milieu inhibe la conversion génique au locus ad3 . Nous pouvons nous demander si la capacité d'une cellule à synthétiser de l'histidine, peut avoir une influence sur la conversion génique à ce locus.

Considérons d'abord l'étude de la conversion génique des souches hétéroalléliques ad3, hétérozygotes pour les mero-suppresseurs dominants. Les souches choisies sont : 02-7 r9 (mero-suppresseur non lié) et 04-4 (ad3-20, avec un mero-suppresseur intragénique). La première souche a été croisée avec une souche ad3-6.

ad3-3 S9-hi (02-7 r9) x ad3-6 (39-6D).

et la souche diploïde obtenue a été étalée sur milieu minimal ou minimal contenant de l'histidine. Le témoin est la souche diploïde formée entre la souche mère 02-7 (sans suppresseur) et la même souche ad3-6.

ad3-3 (02-7) x ad3-6 (39-6D)

Les deux souches ne diffèrent donc que par la présence ou l'absence du mero-suppresseur dominant non lié ; l'accroissement du nombre de colonies prototrophes en fonction du temps est reportée sur la figure 21 A.

Le gène ad3-20 étant hétéroallélique avec ad3-3 et avec ad3-6, on a croisé la souche 04-4 qui le porte avec deux souches, l'une ad3-3, l'autre ad3-6.

ad3-20 S24-hi (04-4) x ad3-3 (4017-C)

ad3-20 S24-hi (04-4) x ad3-6 (4021-D3).

et les deux souches diploides obtenues ont été étalées sur les mêmes milieux. La figure 21B montre l'accroissement du nombre de colonies prototrophes en fonction du temps.

La conversion génique chez la souche hétérozygote pour le mero-suppresseur dominant non lié, est fortement réduite, que l'histidine soit présente ou non (figure 21A). Par contre, chez la souche hétérozygote pour le mero-suppresseur dominant intragénique la conversion génique et son inhibition par l'histidine ont lieu comme d'habitude (figure 21B).

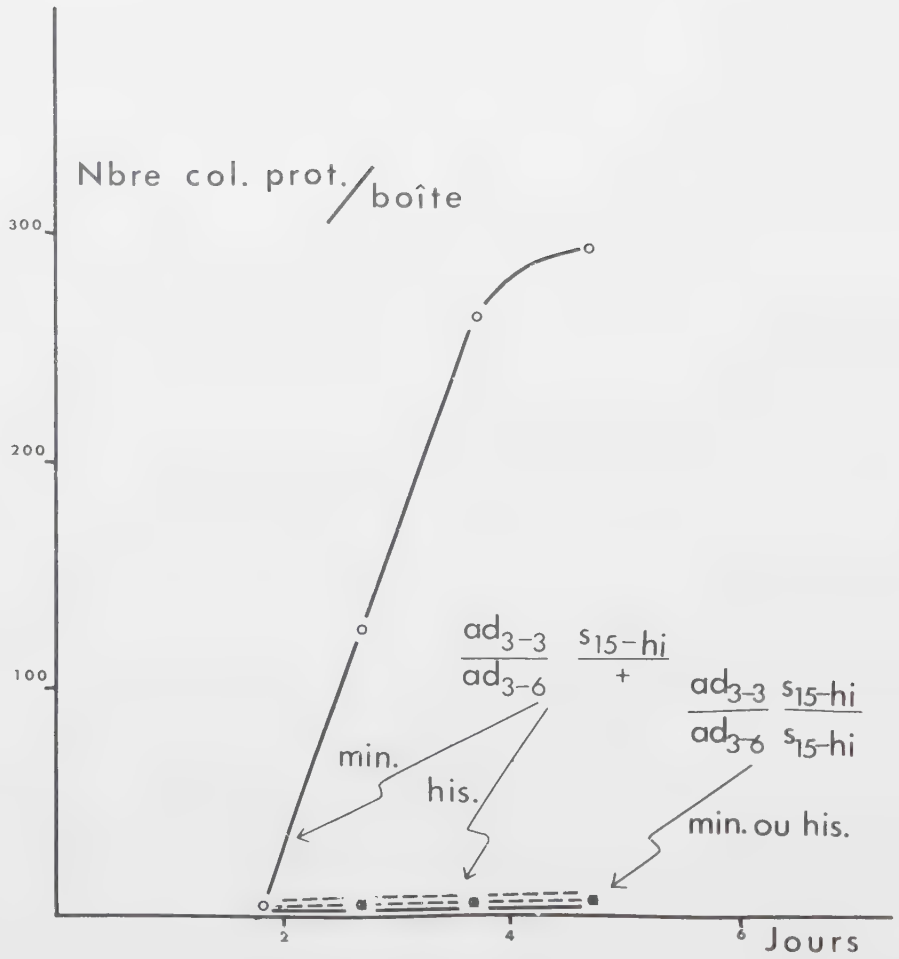


FIGURE 22

Expérience analogue à celle consignée dans la figure 21

Etalement de :

360 000 cellules de la souche de génotype ad3-3/ad3-6 s_{15}-hi/ + (LM 145)

410 000 cellules de la souche de génotype ad3-3/ad3-6 s_{15}-hi/s_{15}-hi (LM 146)

De ces expériences, une première conclusion se dégage : nous sommes en présence d'un cas de suppression de la conversion génique d'un gène par des gènes non liés à celui-ci. De plus, il semble ne pas y avoir de corrélation entre le fait qu'une cellule synthétise de l'histidine et la conversion génique au locus ad3.

Nous pouvons alors nous demander si c'est la localisation génétique des deux mero-suppresseurs étudiés qui est responsable de leurs actions différentes sur la conversion génique. Dans le cas où il y aurait corrélation entre l'inhibition de la conversion génique et la localisation à l'extérieur du locus ad3 du mero-suppresseur, nous devons nous attendre à ce que le mero-suppresseur récessif, également non lié à ad3, agisse sur la conversion génique de la même façon que le mero-suppresseur dominant. Les expériences qui suivent montrent que la présence dans une souche diploïde hétéroallélique ad3 du mero-suppresseur récessif à l'état homozygote, empêche la conversion génique, comme dans le cas du mero-suppresseur dominant non lié.

Chez les souches mutantes que nous possédions, le mero-suppresseur récessif se trouve associé à ad3-3. Pour construire une souche diploïde, hétéroallélique pour ad3 et homozygote pour le mero-suppresseur récessif, il était nécessaire d'introduire ce gène dans une souche ad3-6 . Le protocole de cette expérience est le suivant : les tétrades provenant du diploïde hétéroallélique pour ad3 et hétérozygote pour s15-hi,

ad3-3 s15-hi (02-7 r15) x ad3-6 (39-6D)

sont analysées. Un test d'hétéroallélisme est effectué sur les souches $ade^{-}his^{+}$ issues des spores en les croisant avec des souches ad3-3 et ad3-6. Rappelons que le phénotype de ces diploïdes est $ade^{-}his^{-}$, s15 étant récessif (tableau 10). De plus, le test d'hétéroallélisme est réalisable car, comme on le verra plus loin, le suppresseur recessif, à l'état hétérozygote, n'influe pas la conversion génique. Une souche de génotype ad3-6 s15-hi est croisée avec deux souches ad3-3, possédant ou non le même mero-suppresseur.

ad3-6 s15-hi (83-3D) x ad3-3 s15-hi (02-7 r15)
ad3-6 s15-hi (83-3D) x ad3-3 (02-7)

Ces deux croisements sont effectués dans le but de comparer la conversion génique entre deux souches qui ne diffèrent que par une seule mutation : l'une est homozygote, l'autre est hétérozygote pour le mero-suppresseur récessif.

Les résultats de l'étude de la conversion génique sont consignés sur la figure 22 : un mero-suppresseur récessif à l'état homozygote, empêche complètement la conversion génique de la souche ad3 ; par contre, à l'état hétérozygote, la recombinaison a lieu comme d'habitude et elle est inhibée par l'histidine exogène.

B - Conclusions et discussion de la deuxième partie .

Une conclusion se dégage des expériences citées plus haut : les mero-suppresseurs non liés à ad3 inhibent la conversion génique au locus ad3 tandis que le mero-suppresseur intragénique ne le fait pas.

Quelles hypothèses peut-on envisager pour expliquer l'action différente des mero-suppresseurs sur la conversion génique au locus ad3 ?

Une première hypothèse est que les deux types de mero-suppresseurs conduisent à un niveau différent d'histidine responsable de leurs actions dissemblables. Le niveau serait élevé chez les souches portant le mero-suppresseur externe et faible chez celles portant le mero-suppresseur "intragénique".

Il n'existe pas de méthode directe pour connaître ce niveau. Un dosage de la quantité totale d'histidine libre dans la cellule, ne serait pas suffisant pour connaître la quantité d'histidine réellement disponible pour inhiber la conversion génique. L'étude de la croissance de différentes souches - évaluées en notant le nombre de jours nécessaires à une cellule pour donner naissance à une colonie visible - se heurte à l'objection que nous venons de signaler. Toutefois, remarquons que les souches qui croissent le plus lentement en milieu contenant seulement de l'adénine (7 jours au lieu de 5 jours) sont celles ou la conversion génique a lieu normalement.

Un moyen moins indirect pour évaluer la concentration d'histidine réellement efficace pour inhiber la conversion génique, est l'étude de la dérepression de l'histidinol deshydrogénase. Lors de cette étude (voir chapître IV), nous avons mis en évidence que chez une souche prototrophe le niveau de l'histidinol-deshydrogénase est toujours bas et indépendant des conditions de culture de la souche. Cependant il est possible d'obtenir une dérepression de cet enzyme chez des souches auxotrophes his^-, par une carence prolongée en histidine. Si le niveau supérieur d'histidine endogène était la cause de l'inhibition de la conversion génique chez des souches portant un mero-suppresseur externe, par rapport à un niveau plus faible chez les souches portant un mero-suppresseur interne, on devrait s'attendre à ce que, chez les deux souches cultivées en milieu minimal ou milieu contenant de l'adénine, l'histidinol-deshydrogénase soit réprimé chez la première et non chez la deuxième. Une expérience préliminaire réalisée chez une souche haploïde portant un mero-suppresseur externe (ad3 s21-hi) a montré que le niveau de l'histidinol-deshydrogénase est quatre fois supérieur quand la souche est cultivée en milieu contenant de l'adénine que lorsqu'elle est cultivée en milieu contenant de l'adénine et de l'histidine (tableau 18, chapitre IV). Ce résultat montre que l'histidine endogène n'est pas suffisante pour réprimer l'histidinol-deshydrogénase et ceci justement pour une souche portant un mero-suppresseur externe. Si ce résultat se généralisait pour toutes les souches portant un suppresseur externe ou interne, la première

hypothèse serait à exclure.

Une deuxième hypothèse est alors possible pour expliquer l'action différente des suppresseurs externe ou interne sur la conversion génique, hypothèse liée à une explication éventuelle du mécanisme biochimique de la suppression.

Parmi les différents mécanismes proposés pour expliquer l'action des suppresseurs externes (voir BENNETT et DREYER, 1964) , nous retiendrons celui qui fait intervenir l'ARN de transfert (YANOFSKY, HELINSKI et MALING, 1961) et tout particulièrement le mécanisme de restauration des mutations "non-sens" (BENZER et CHAMPE, 1962 ; GAREN et SIDDIQI, 1962).

Si le changement d'une paire de bases de l'ADN (mutation), transforme un codon "sens" et un codon "non-sens", ceci se répercute sur la traduction de l'ARN messager en protéine : les ARN de transfert (un pour chaque acide aminé) ne peuvent pas "lire" efficacement le codon "non-sens" . Si le suppresseur externe était responsable de la formation d'un ARN de transfert nouveau, spécifique pour un acide aminé donné, on pourrait imaginer que cet ARN serait capable de donner un sens (au moins partiel) à un codon "non-sens", grâce à une grande efficacité de "lecture" (figure 23A). Un corollaire de ce mécanisme hypothétique est que le suppresseur externe devrait être spécifique pour certaines mutations du locus ad3, car il est peu probable que toutes les mutations ad3 soient du même type "non-sens". A l'heure actuelle, nous savons que le suppresseur externe récessif supprime ad3-3 et ad3-6, mais nous n'avons pas encore essayé d'autres mutants ad3.

Comment cet ARN de transfert pourrait-il inhiber la conversion génique ?

Nous pouvons envisager le modèle suivant : (figure 23B) le nouvel ARN de transfert pourrait s'associer avec un des brins de l'ADN (qui doit avoir une séquence complémentaire), et de ce fait, empêcher la recombinaison. Il est indispensable d'admettre que ce nouvel ARN ait une affinité plus élevée avec une séquence de nucléotides complémentaires que les ARN normaux, sinon ceux-ci inhiberaient aussi la recombinaison.

Ce modèle permet de faire des prévisions : chez les bactéries ou des suppresseurs externes permettent l'expression des mutations "non-sens", on devrait s'attendre à ce que la recombinaison génétique entre ces mutants "non-sens" soit inhibée par la présence du gène suppresseur dans le même génome.

Quant aux suppresseurs internes d'ad3, la restauration du phénotype histidine pourrait être dûe soit à une nouvelle mutation au site même (HENNING et YANOFSKY, 1962), soit à une mutation dans un site voisin qui permettrait un changement du cadre de lecture du code (CRICK, BARNETT, BRENNER et WATTS-TOBIN, 1961 ; HELINSKI et YANOFSKY, 1963). L'un ou l'autre mécanisme de restauration ne devrait avoir aucune influence sur la conversion génique .

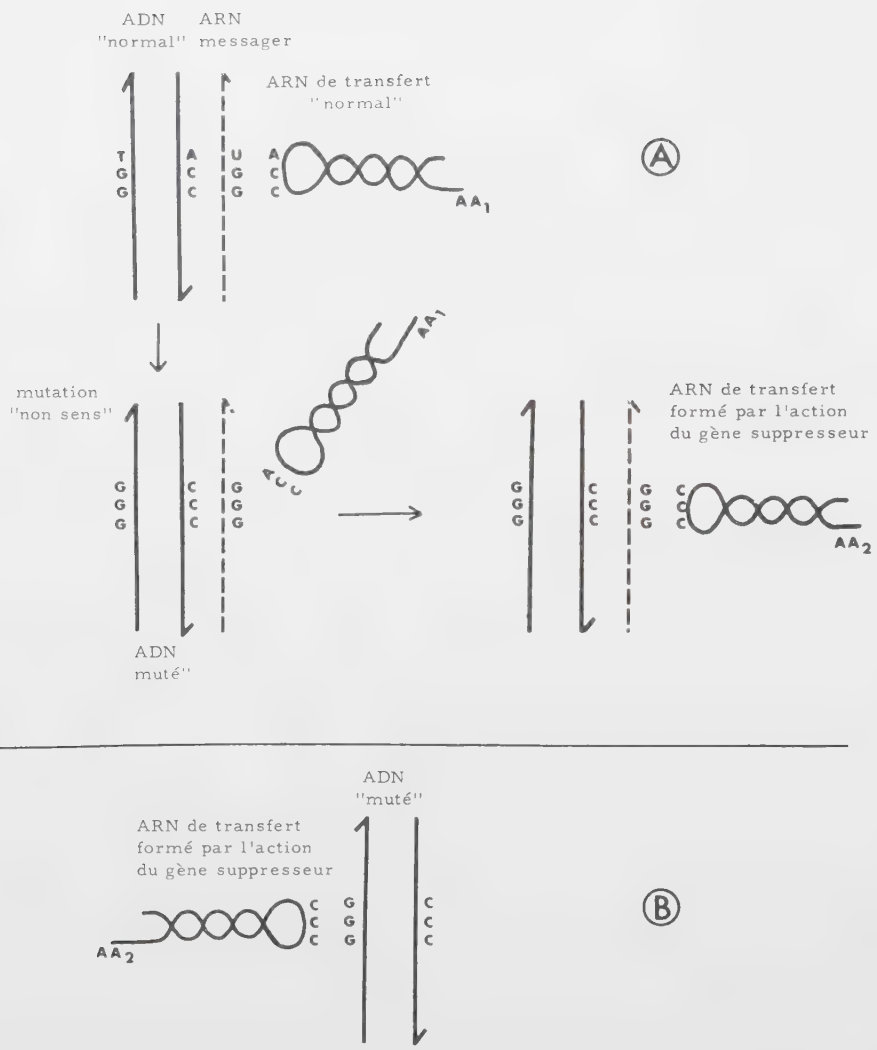


FIGURE 23

A : Schéma de restauration biochimique d'une mutation "non sens" par un suppresseur externe

B : Schéma de suppression de la conversion génique par un suppresseur externe

CHAPITRE IV

QUELQUES ASPECTS DE LA BIOSYNTHESE ET DE LA REGULATION DE LA BIOSYNTHESE DE L'ADENINE ET DE L'HISTIDINE CHEZ LA LEVURE

I - INTRODUCTION

Dans les chapîtres précédents, nous avons considéré en détail des expériences montrant une inhibition par l'histidine de la conversion génique au locus ad3.

Le fait qu'un produit final d'une chaîne de biosynthèse inhibe un évènement génétique la concernant, suggère la possibilité d'un rapport entre l'inhibition de la conversion génique et les mécanismes de régulation de la cellule. Cependant, pour évaluer ce rapport, il est nécessaire tout d'abord de préciser les biosynthèses de l'adénine et de l'histidine et les mécanismes de leur régulation chez la levure.

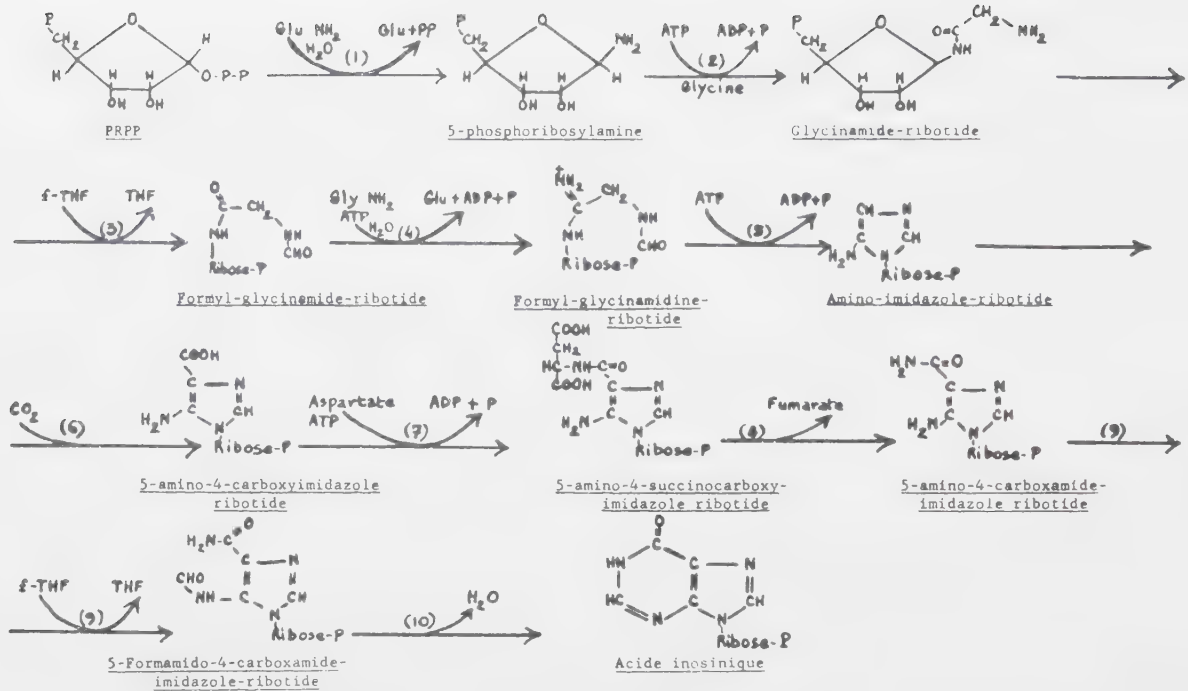
II - ETAT ACTUEL DE NOS CONNAISSANCES SUR CE SUJET CHEZ D'AUTRES ORGANISMES.

Le coeur de pigeon a été utilisé par BUCHANAN et coll. (1959) pour étudier la biosynthèse de l'adénine, dont les étapes sont décrites dans les figures 24, I et II. La biosynthèse de l'histidine a été étudiée par AMES et coll. (AMES et HARTMAN, 1962 ; SMITH et AMES, 1964) chez Salmonella thyphimurium (figure 25).

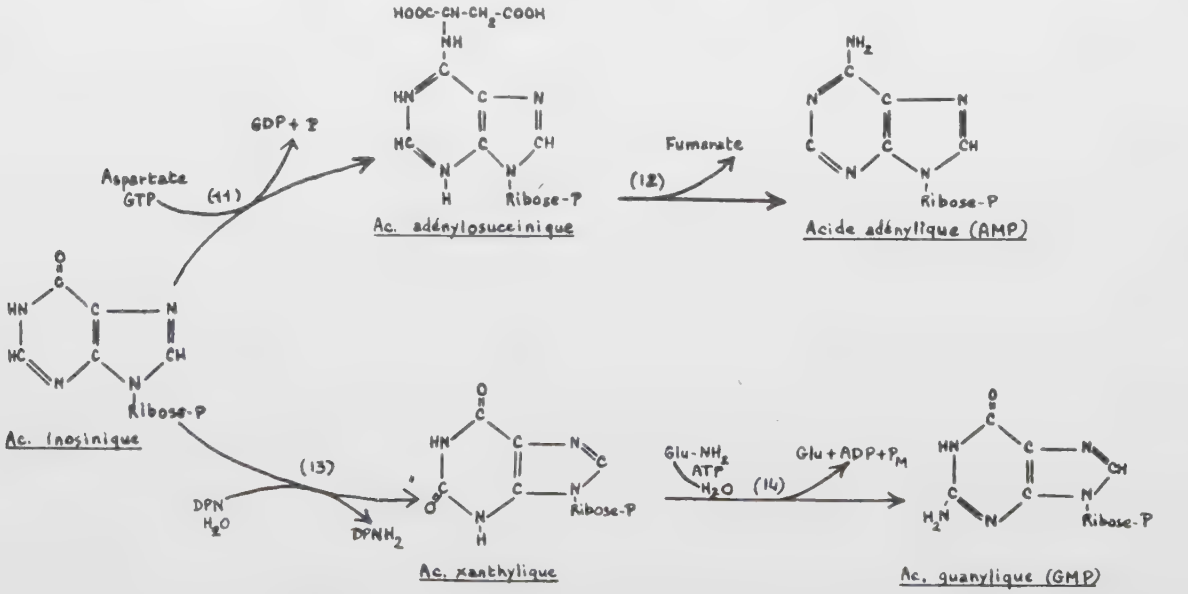
La biosynthèse de l'adénine et celle de l'histidine ne sont pas indépendantes ; bien au contraire, l'adénine est le précurseur naturel et obligatoire de l'histidine. Ainsi, l'ATP * est le substrat de la PR-ATP pyrophosphorylase, premier enzyme de la chaîne de biosynthèse de l'histidine. MOYED et MAGASANIK (1960), en utilisant des isotopes, ont pu mettre en évidence chez Aerobacter aerogenes que le C_2 et le N_1 de l'adénine se retrouvent

---

* Abbréviations : ATP, adénosine triphosphate ; PR-ATP, phosphoribosyl-ATP ; PRPP, phosphoribosyl pyrophosphate ; IGP, imidazole glycérol phosphate ; AIR, amino-imidazole ribotide ; AICAR, amino imidazole carboxamide ribotide ; R5P, ribose-5-phosphate ; SAICAR, succino-AICAR ; PGA, acide phosphoglycérique ; EDTA, acide éthylène diamine tétracétique ; AM-3'P, adénosine 3'-phosphate ; AM-5'P, adénosine 5'-phosphate ; GTP, guanosine triphosphate ; IMP, inosine phosphate ; DPN, diphosphopyridine nucléotide ; DPNH, DPN réduit ; INT, 2 p-iodophényl 5 p-nitrophényl 5-phényl tétrazolium chlorure ; TRIS, trihydroxyméthyl aminométhane.



I - BIOSYNTHESE DE L'ACIDE INOSINIQUE (d'après BUCHANAN et HARTMAN, Adv. Enzymol., 1959)



II - BIOSYNTHESE DE L'AMP et du GMP (d'après Buchanan et Hartman, Adv. Enzymol., 1959).

FIGURE 24
(I et II)

Biosynthèse de l'adenine (d'après BUCHANAN et HARTMAN, 1959)

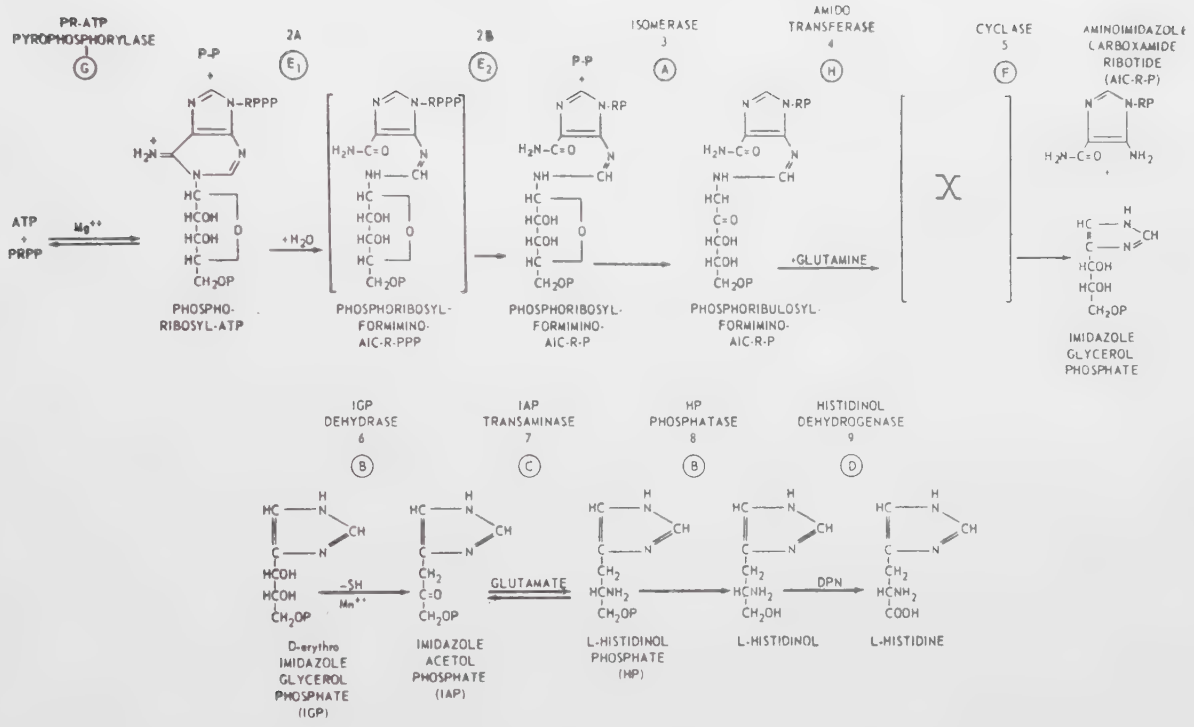


FIGURE 25

Biosynthèse de l'histidine (d'après AMES et HARTMAN, 1963)

dans le noyau imidazole de l'histidine en tant que C_2 et N_1 . Cette conversion de l'adénine en histidine conduit en même temps à la formation d'AICAR lui-même précurseur normal de l'adénine. La figure 26 schématise la biosynthèse de l'adénine et celle de l'histidine et leurs relations.

La mutation ad3 conduit aux besoins simultanés en adénine et en histidine. Il n'est pas facile de situer cette mutation par rapport au schéma précédent. Ainsi, tout point de coupure métabolique dans la région 1 (figure 26) conduit au besoin unique en adénine ; dans la région 2 au besoin en histidine seulement. Un point de coupure dans la région 3 conduit aussi à un besoin en adénine; mais ces mutations présentent un phénomène supplémentaire . Ces souches ont un besoin absolu en adénine, mais le rendement en masse vivante par rapport à l'adénine peut être augmenté en ajoutant de l'histidine. Certains mutants chez E. coli (HP-1 par exemple) ont été décrits par MAGASANIK et KARIBIAN (1960) et ils présentent ce phénomène dit d'épargne. (Si 8 µg d'adénine permettent la production d'une population cellulaire de $4,5 \times 10^8$ cellules, la quantité d'adénine nécessaire pour produire une population de la même taille, en présence de 20 µg d'histidine est réduite à 3 µg).

Ce phénomène est expliqué par la rétroinhibition exercée par l'histidine sur la PR-ATP pyrophosphorylase qui empêche la perte d'une partie de l'adénine en forme de AICAR, ce dernier ne pouvant pas être utilisé du fait de la déficience enzymatique dûe à la mutation.

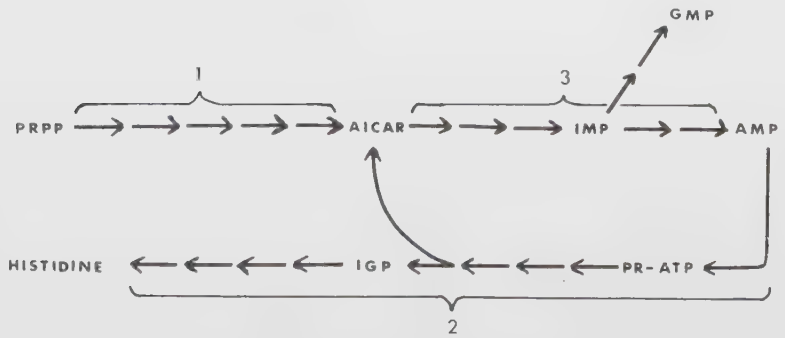


FIGURE 26

Relation entre les biosynthèses de l'adenine et de l'histidine.

Il faut souligner que les souches ad3 ne présentent pas ce phénomène d'épargne. Rappelons que dans l'expérience décrite dans la figure 2 du chapître II, nous avons montré que 1 mg d'histidine permet une croissance de 103 mg de poids sec lorsque l'adénine est en excès ; environ la même croissance (90 mg) est obtenue en présence de 1 mg d'adénine lorsque l'histidine est en excès. De plus, CLAVILIER (1962) a montré que cette relation entre la croissance maximale et la quantité de métabolite exigée, reste la même lorsqu'on fait varier la quantité de métabolite complémentaire.

Le fait que les souches ad3 aient une exigence absolue en adénine et en histidine, ne permet pas de placer leur point de coupure de la chaîne métabolique dans aucune des trois régions de la figure 26.

Il est bien évident que cette discussion n'a de sens que si les biosynthèses de l'adénine et de l'histidine chez la levure sont les mêmes que chez les bactéries. Nous verrons au cours de ce chapître que plusieurs faits expérimentaux sont en accord avec cette hypothèse.

III - DONNEES BIOCHIMIQUES CHEZ LA LEVURE .

Au moment où nous avons entrepris ce travail aucune donnée concernant la biosynthèse de l'histidine n'était alors connue. Par contre, en ce qui concerne l'adénine, quelques études avaient été réalisées.

Lorsque la levure est cultivée dans un milieu déficient en biotine, elle accumule de l'AIR(WOODWARD et RAINBOW, 1961) arylamine dosée selon la méthode de BRATTON et MARSHALL (1939) . Cette accumulation est toujours accompagnée de la formation d'un pigment rouge . Or, on connaît chez la levure deux mutations non alléliques conduisant à l'exigence en adénine, ad_1 (REAUME et TATUM, 1949) et ad2 (EPHRUSSI, HOTTINGUER et TAVLITZKI, 1949b) . Le précurseur de l'adénine accumulé quand la culture, ou la colonie, pousse en quantité limitante d'adénine, conduit à la formation d'un pigment rouge. DORFMAN (1962) a pu démontrer que les souches ad_1 et ad2 accumulent effectivement l'AIR.

Ces expériences montrent qu'au moins une étape de la biosynthèse de l'adénine chez la levure est la même que chez les autres organismes. Il était intéressant de voir si l'on pouvait aller plus loin.

Nous avons un critère simple qui permet de montrer un parallélisme plus précis de ces voies biosynthétiques, entre la levure et les autres organismes. Il nous semble suffisant de considérer le cycle AMP - AICAR - AMP : s'il est présent dans des extraits acellulaires et si l'histidine est capable d'inhiber son fonctionnement, nous aurions deux argu-

ments en faveur de l'existence de voies biosynthétiques analogues pour l'histidine chez les bactéries et la levure.

Cette étude fera l'objet de la première partie du présent chapître.

Rappelons maintenant les données de la littérature sur les mécanismes de régulation de la biosynthèse de l'adénine et de l'histidine chez plusieurs organismes.

En ce qui concerne la biosynthèse de l'adénine, WYNGAARDEN et ASHTON (1959) ont étudié le premier enzyme de la chaîne, la PRPP-amidotransférase du foie de pigeon, et ils ont trouvé que l'ATP inhibe spécifiquement cet enzyme "in vitro". D'autres travaux effectués "in vivo" sur des microorganismes apportent des preuves de l'existence de ce type de rétro-inhibition. Par exemple, la non accumulation des produits intermédiaires chez des mutants exigeants l'adénine, quand ils croissent en excès de ce métabolite. Chez la levure également, les mutants ad2 n'accumulent l'AIR que quand ils sont carencés en adénine. De plus, il est vraisemblable que l'inhibiteur spécifique du premier enzyme de la chaîne ne soit pas l'ATP, mais l'IMP (BURNS, 1964).

En ce qui concerne la biosynthèse de l'histidine, les mécanismes de régulation chez plusieurs microorganismes sont mieux connus. Une des premières étapes est inhibée par l'histidine chez E. coli (MOYED et FRIEDMAN, 1959) et chez A. aerogenes (MOYED et MAGASANIK, 1960). Chez S. thyphimurium, MARTIN (1962) a poussé l'étude plus loin. Il a isolé et purifié le premier enzyme, la PR-ATP pyrophosphorylase et a pu montrer que l'histidine inhibe l'activité enzymatique, cette inhibition étant du type non compétitif.

La rétroinhibition par l'histidine chez la levure sera décrite dans la première partie du présent chapître.

La répression des enzymes biosynthétiques de l'histidine est certainement un des cas de répression les mieux connus. AMES et GARRY (1959) ont montré que chez des souches sauvages de S. thyphimurium, cultivées en présence ou absence d'histidine, tous les enzymes existent en faible quantité. Quand on cultive des mutants auxotrophes en limitation d'histidine, les concentrations intracellulaires de tous les enzymes sont augmentées une trentaine de fois. Ce phénomène, appelé répression coordonnée, consiste en l'accroissement parallèle des activités spécifiques de tous les enzymes concernant la même voie biosynthétique, lorsqu'une cellule auxotrophe est carencée en produit final. On sait par ailleurs (HARTMAN, LOPEZ et SERMAN, 1960) que tous les gènes qui gouvernent les enzymes de la biosynthèse de l'histidine chez S. thyphimurium se trouvent liés sur le chromosome bactérien, constituant un opéron.

L'étude de la répression de deux enzymes concernant la biosynthèse de l'histidine chez la levure, fera l'objet de la deuxième partie du présent chapître.

IV - PREMIERE PARTIE - ETUDE DE LA PARTIE CYCLIQUE DE LA BIOSYNTHESE DE L'HISTIDINE CHEZ LA LEVURE .

A. Introduction .

Quand nous avons entrepris ce travail, les premières étapes (1 à 5, figure 25) de la biosynthèse de l'histidine chez les bactéries n'étaient pas connues. On savait par contre que lorsqu'on incube un extrait bactérien avec ATP, un système générateur d'ATP, R5P, et glutamine, on obtient de l'AICAR (LOVE et BOYLES, 1959). MOYED et MAGASANIK (1960) avaient confirmé ces travaux et avaient pu mettre en évidence que la réaction se fait en deux étapes (figure 27) . La première aboutit à la formation du composé "III", la deuxième à la formation, en présence de glutamine, de IGP et AICAR, à partir du composé "III". Seule la première étape est inhibée par l'histidine.

Nous avons montré que cette partie cyclique existe aussi chez la levure (KLOPOTOWSKI, LUZZATI et SLONIMSKI, 1960) et que l'histidine inhibe le premier enzyme de la chaîne , comme dans les systèmes bactériens. En outre, nous avons pu mettre en évidence l'existence d'au moins une nouvelle étape dans la biosynthèse de l'histidine, étape située avant le présumé composé "III" .

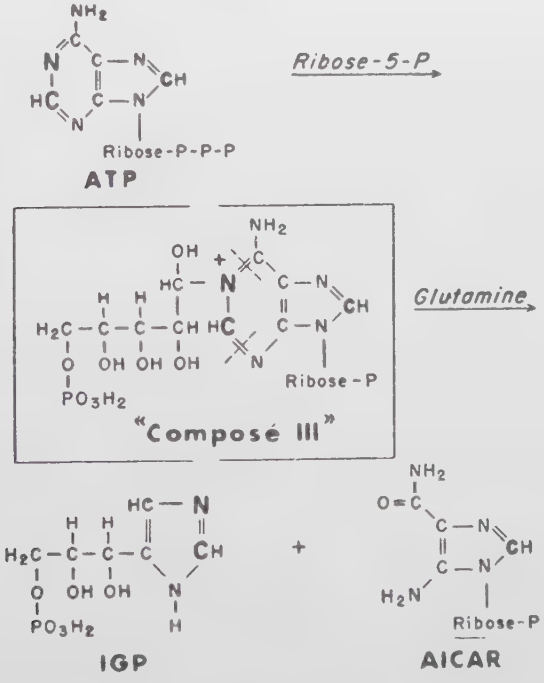


FIGURE 27

Transformation de l'ATP et du R5P en IGP et AICAR
(selon MOYED et MAGASANIK, 1960)

Tout ceci est en accord avec les connaissances actuelles sur les premières étapes de la biosynthèse de l'histidine. (figure 25).

B - Matériel et méthodes .

1. Produits chimiques .

Tous les produits chimiques sont des produits commerciaux, du plus haut degré de pureté disponible . Les billes de verre Prismo-France (diamètre 50-150 µ) ont été bouillies avec de l'HCl 5N, lavées ensuite avec de l'HCl N jusqu'à ce que les eaux de lavage soient incolores, puis avec de l'eau distillée jusqu'à élimination complète des ions Cl^- .

2. Souches .

Nous avons utilisé des souches diploïdes, soit hétéroalléliques pour ad3 (LM 27), soit une souche prototrophe provenant de la première par conversion génique (LM 2) .

3. Cultures .

La levure est ensemencée, à partir d'une préculture en milieu naturel (YPGA) dans le milieu minimal (G0) contenant 40 mg/l d'adénine et 20 mg/l d'histidine. L'ensemencement est assez faible pour que, au bout de 20-24 heures d'incubation à 28°C avec une bonne aération, la culture soit encore en phase logarithmique (100 à 200 unités Klett, correspondant à 250 à 500 mg de poids sec/l). La récolte se fait par centrifugation, le culot est lavé avec de l'eau distillée et remis en suspension dans du tampon phosphate de potassium 0,1 M ($KH_2PO_4 + K_2HPO_4$) , à une concentration de 80 mg ps/ml.

4. Broyage .

Nous avons utilisé un broyeur Lourdes, toutes les manipulations étant effectuées à 0°C. Pour 3 ml de suspension de levure on ajoute 4 g de billes de verre. Le temps de broyage est de 5 minutes, en deux périodes de 3 et 2 minutes, avec un arrêt de 3 minutes.

5. Obtention de l'extrait .

Le broyat est centrifugé à 25 000 g pendant 20 min, à 0°C; le culot est lavé avec le même volume de tampon phosphate 0,1 M et la suspension est centrifugée à nouveau. Les deux surnageants sont mélangés et dialysés contre le même volume de tampon phosphate 0,01 M pendant 16 heures. L'extrait ainsi obtenu contient, en général, environ 15 mg de protéines/ml, dosées par la méthode au biuret. L'extrait peut être gardé plusieurs jours à -25°C sans que son activité enzymatique diminue d'une façon appréciable.

6. Détermination de l'activité enzymatique .

L'activité enzymatique a été déterminée par la méthode de LOVE et BOYLES (1959) légèrement modifiée.

On incube, par millilitre, 10 µmoles de R5P, 2 µmoles de KNaATP, 15 µmoles de phosphoglycérate de potassium, 7,5 µmoles de glutamine, 100 µmoles de C12Mg, 50 µmoles de tampon phosphate de potassium (pH 7,4) et 3 mg de protéines de l'extrait. L'incubation est faite à 37°C, la réaction est arrêtée par addition d'acide trichloroacétique 5 % et l'AICAR est mesuré par la réaction de BRATTON et MARSHALL (1939), caractéristique des arylamines. La lecture de la densité optique est effectuée à 540 mµ avec un spectrophotomètre Jean et Constant. Les concentrations d'arylamine (exprimées en mµmoles d'AICAR par ml de milieu d'incubation) peuvent être calculées à l'aide d'une courbe étalon établie avec une solution d'AICA . Nous avons mesuré seulement les arylamines non-acétylables, c'est-à-dire après 20 min. d'incubation à la température de la pièce avec de l'anhydride acétique à la concentration finale de 10 %. Deux types d'arylamine ont été mesurées : arylamine libre, directement, et arylamine totale, après hydrolyse acide , (HCl 1N, 100°C, 20 min.) . La différence entre les deux déterminations est une mesure de la concentration du composé " III ", selon la définition de MOYED et MAGASANIK.

C- Résultats et discussion .

1. Formation d'arylamines .

Les extraits enzymatiques de levure, aussi bien d'une souche ad3 que d'une souche AD3, forment des arylamines en présence de ATP, R5P, glutamine, PGA et C12Mg dans les conditions décrites ci-dessus. L'accroissement des arylamines après hydrolyse acide montre l'accumulation d'une substance assez labile, probablement le "composé III ". La réaction est linéaire (figure 28) en fonction du temps.

On trouve aussi une stricte proportionnalité entre l'arylamine formée par heure et la quantité de protéines (figure 29). Il faut remarquer toutefois que la droite ne s'extrapole pas à l'origine des coordonnées : un seuil est toujours présent et varie assez d'un extrait à l'autre, beaucoup plus que la pente.

2. Omissions et facteurs limitants .

a) le R5P n'est pas en concentration limitante, Il est cependant indispensable à la réaction car, en son absence, la formation d'arylamine n'a pas lieu. Il peut être remplacé par PRPP à la concentration de 1mM : dans ces conditions la formation des arylamines a lieu comme en présence de R5P 10 mM.

b) L'ion potassium est indispensable, car lorsque tous les constituants du

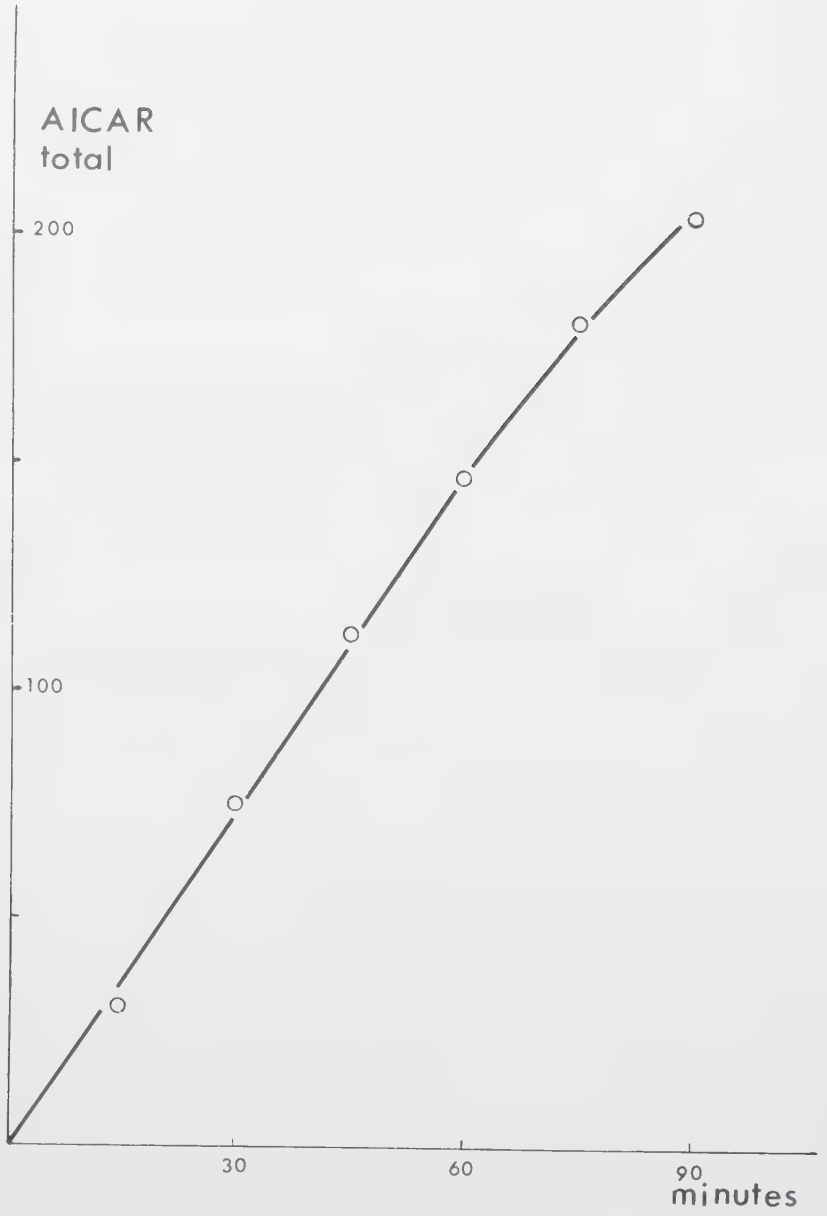


FIGURE 28

Formation d'AICAR par un extrait acellulaire de levure :
linéarité de la réaction en fonction du temps

On incube, par ml, 10 µmoles de R5P, 3 µmoles de KNaATP, 15 µmoles de PGA (sel de potassium), 7,5 µmoles de glutamine, 100 µmoles de Cl_2Mg, 50 µmoles de tampon phosphate de potassium (pH 7,4) et 3 mg de protéine de l'extrait. L'incubation est faite à 37° C, la réaction est arrêtée par addition d'acide trichloroacétique 5 % et l'AICAR total, mesuré par la réaction de BRATTON et MARSHALL, est exprimé en mµmoles par ml. de milieu d'incubation.

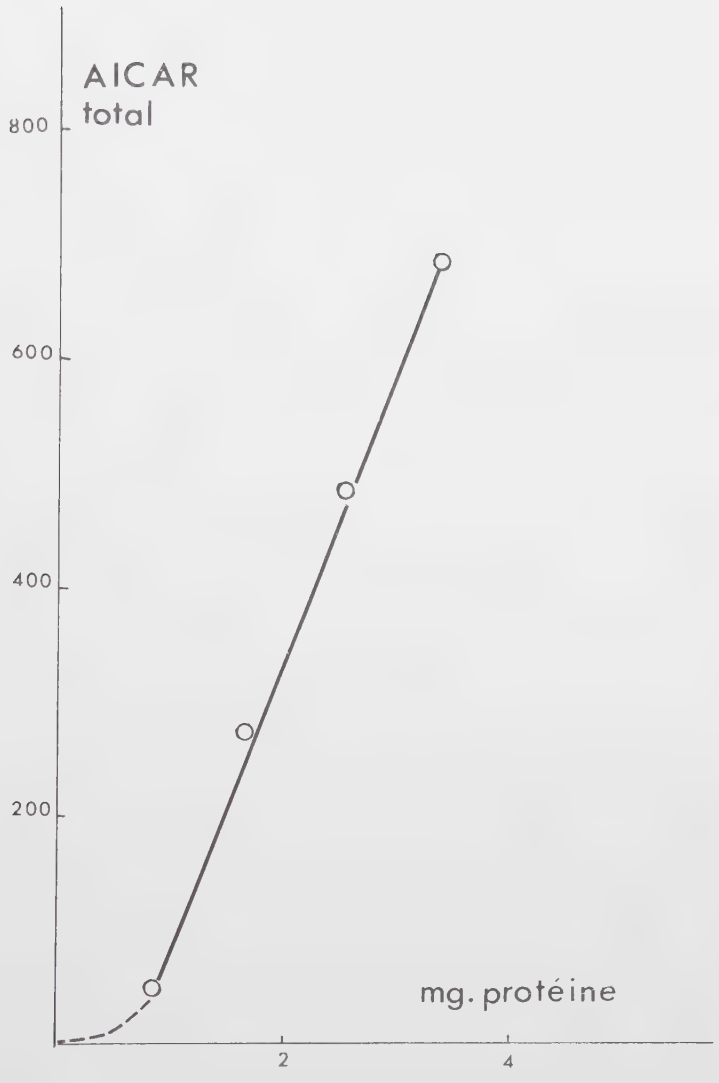


FIGURE 29

Formation d'AICAR par un extrait acellaire de levure :
Proportionnalité entre l'AICAR formé et la quantité de protéines de l'extrait

Pour les conditions, voir figure 28
L'AICAR est exprimé en mμmoles par heure en fonction des mg. de protéines de l'extrait, le tout par ml. de milieu d'incubation.

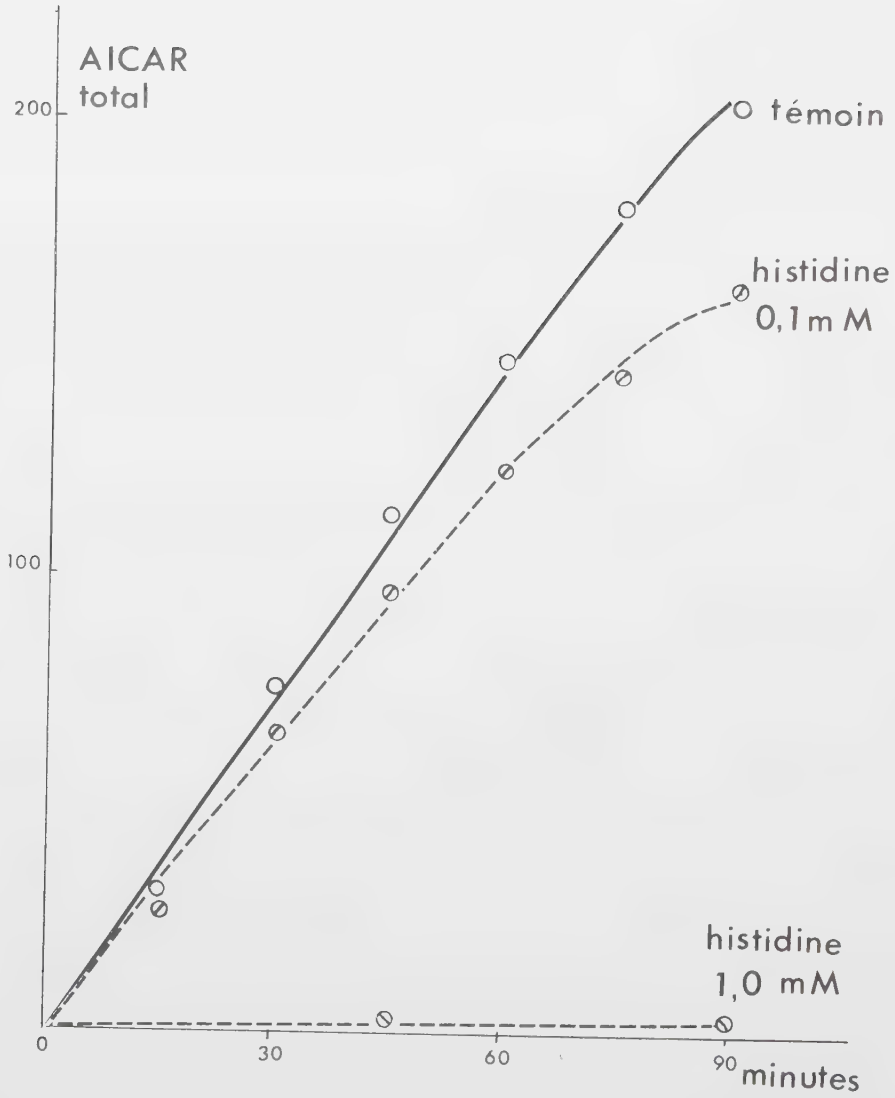


FIGURE 30

Formation d'AICAR par un extrait acellulaire de levure : inhibition par l'histidine.
Pour les conditions, voir figure 28.

mélange des réactifs sont sous forme de sel de sodium, la réaction est diminuée de 90 % . Ce point mériterait d'être approfondi surtout lorsqu'on sait que la PR-ATP pyrophosphorylase chez S. thyphimurium a besoin d'ion sodium pour son activité (MARTIN, 1962).

c) ATP est en excès car lorsque sa concentration habituelle est doublée, la répercussion sur la quantité des arylamines formées est très faible.

d) L'omission de glutamine conduit à la diminution de la formation des arylamines. Cette diminution est en moyenne de 20 % en ce qui concerne AICAR total et 40 % en ce qui concerne AICAR libre. On observe cependant une variation considérable entre les extraits provenant de cultures et de souches différentes, sans que l'on puisse attribuer cette variation à une cause précise. Dans les cas extrêmes, certains extraits ont montré une diminution allant jusqu'à 70 % de l'AICAR libre, tandis que d'autres n'ont montré que peu de diminution. Une explication possible de ces résultats serait qu'il existe dans les extraits une source de NH_2 d'une affinité voisine ou supérieure à celle de la glutamine et que cette source ne se trouverait pas en excès. Il est intéressant de noter que l'asparagine à une concentration de 15 mM stimule la réaction de 30 %.

3 . Inhibiteurs .

a) Bases nucléiques et substances analogues.

L'adénine inhibe la réaction entre 50 et 68 % ; l'hypoxanthine entre 70 et 90 %. Dans deux extraits différents le rapport d'inhibition entre hypoxanthine et adénine, est constant : 1,4 . Ceci est tout à fait comparable aux données de LOVE et BOYLES (1959). D'autres inhibiteurs sont : orotate 90 % ; inosine de 55 à 80 % ; adénosine 10 % et GTP 20 %.

Aucune inhibition n'a été trouvée avec AM-3'P, AM-5'P, IMP, ATP et DPN. Toutes ces substances ont été utilisées à une concentration de 1 mM.

Une interprétation possible de l'action de l'adénine et de l'hypoxanthine serait qu'elles entrent en compétition avec l'ATP pour l'utilisation du PRPP, en donnant les nucléotides correspondants. La même explication est valable pour l'orotate. En ce qui concerne l'inosine, l'hypoxanthine formée enzymatiquement (KALCKAR, 1947) expliquerait son action inhibitrice.

b) Histidine et substances analogues .

L'addition de l'histidine 1 mM au temps 0 conduit à une inhibition presque totale de l'activité enzymatique. Ceci se reproduit avec tous les extraits utilisés, indépendamment de la souche et des conditions de culture. Dans les mêmes conditions, l'histidine 0,1 mM conduit à une inhibition bien plus faible, de l'ordre de 17 % (figure 30).

Des substances apparentées à l'histidine, comme 1-méthylhistidine, 3-méthyl-

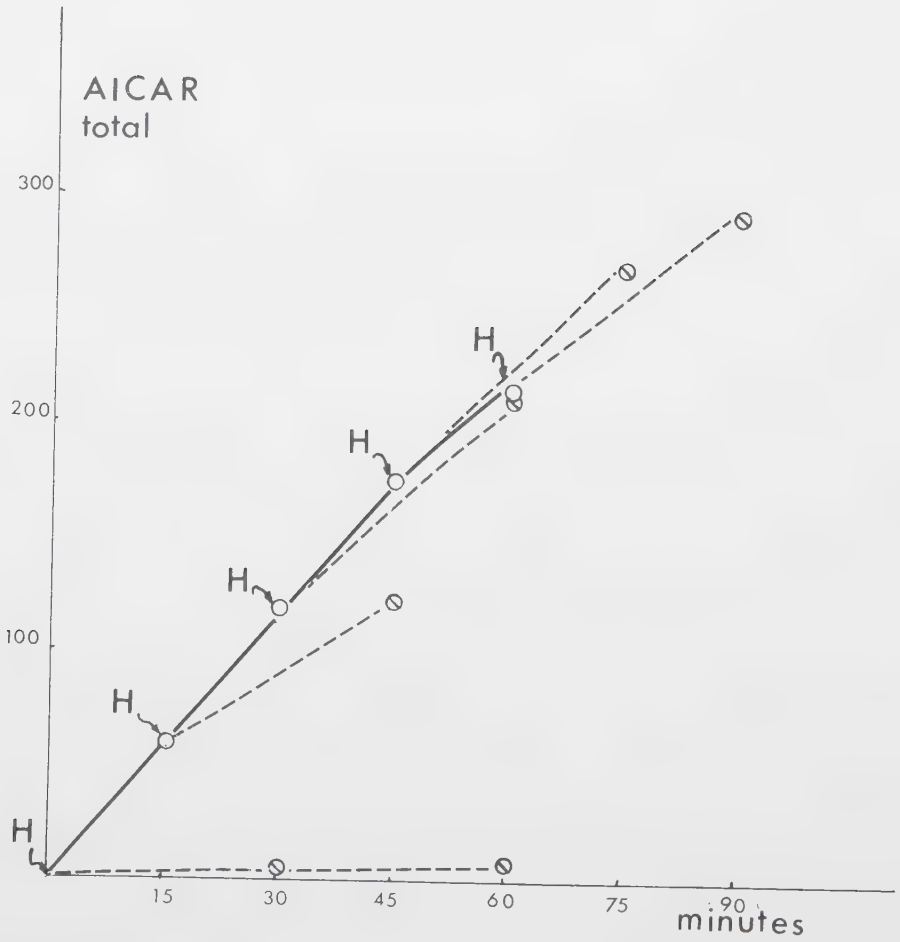


FIGURE 31

Formation d'AICAR par un extrait acellulaire de levure : acquisition de la résistance à l'action de l'histidine au cours de la réaction

histidine, histamine et urocanate n'ont aucune action. Par contre, l'histydil-histidine inhibe la réaction de 55 % ; ceci est probablement dû à une faible hydrolyse produisant de l'histidine.

4 - Acquisition de la résistance à l'inhibition par l'histidine .

Comme il a été dit dans le paragraphe précédent, l'histidine ajoutée au début de la réaction, inhibe totalement la formation des arylamines. Le degré de cette inhibition est pratiquement constant tout au long des 90 minutes d'incubation. Autrement dit, les réactions enzymatiques qui conduisent à la formation des arylamines n'échappent pas à l'inhibition par l'histidine lorsque celle-ci se trouve ajoutée au début de la réaction.

Il n'en est pas de même lorsque l'on ajoute l'histidine à des moments différents au cours de la réaction. Comme on le voit sur la figure 31, l'addition d'histidine 1 mM au temps 0 conduit à une inhibition de 96 %, tandis que les additions ultérieures à des temps différents (la formation des arylamines totales étant mesurée pendant le même intervalle de 30 minutes après l'addition d'histidine) sont de moins en moins inhibitrices.

Cette acquisition de la résistance au cours du temps peut être expliquée " à priori " par deux types d'hypothèses : pendant le cours de la réaction il se forme : a) une substance qui lève l'inhibition par l'histidine, b) un métabolite qui peut être transformé enzymatiquement en "composé III " et AICAR libre, même en présence d'histidine. Ce nouveau métabolite hypothétique, que nous appellerons "X", ne doit pas être transformé en AICAR libre par une faible hydrolyse acide, ce qui permet de le distinguer du "composé III ".

L'expérience de l'inhibition de la réaction par l'histidine 0,1 mM (figure 30) n'est pas en faveur de la première hypothèse. Si cette hypothèse était correcte, le degré d'inhibition provoqué par une faible concentration d'histidine devrait diminuer continuellement au cours de la réaction. En d'autres termes, dans un système partiellement inhibé par l'histidine, la cinétique de formation de AICAR total devrait être exponentielle ; or elle est linéaire.

Par contre, une autre expérience est très largement en faveur de la deuxième hypothèse.

Nous avons pu mettre en évidence l'accumulation du composé "X" , à défaut de la purification des différents enzymes du système, grâce à l'utilisation d'un extrait qui avait perdu presque totalement l'activité de formation d'arylamines totales par deux cycles de congélation et décongélation (figure 32, courbe A). Cet extrait stimule de 50 % l'activité d'un extrait normalement actif aussi bien quand le mélange est fait au temps 0 (courbe C), que lorsque le système est incubé avec l'extrait inactif pendant 30 minutes et l'extrait actif ajouté ensuite (courbe D).

L'addition d'histidine au temps 0 bloque complètement l'activité de deux

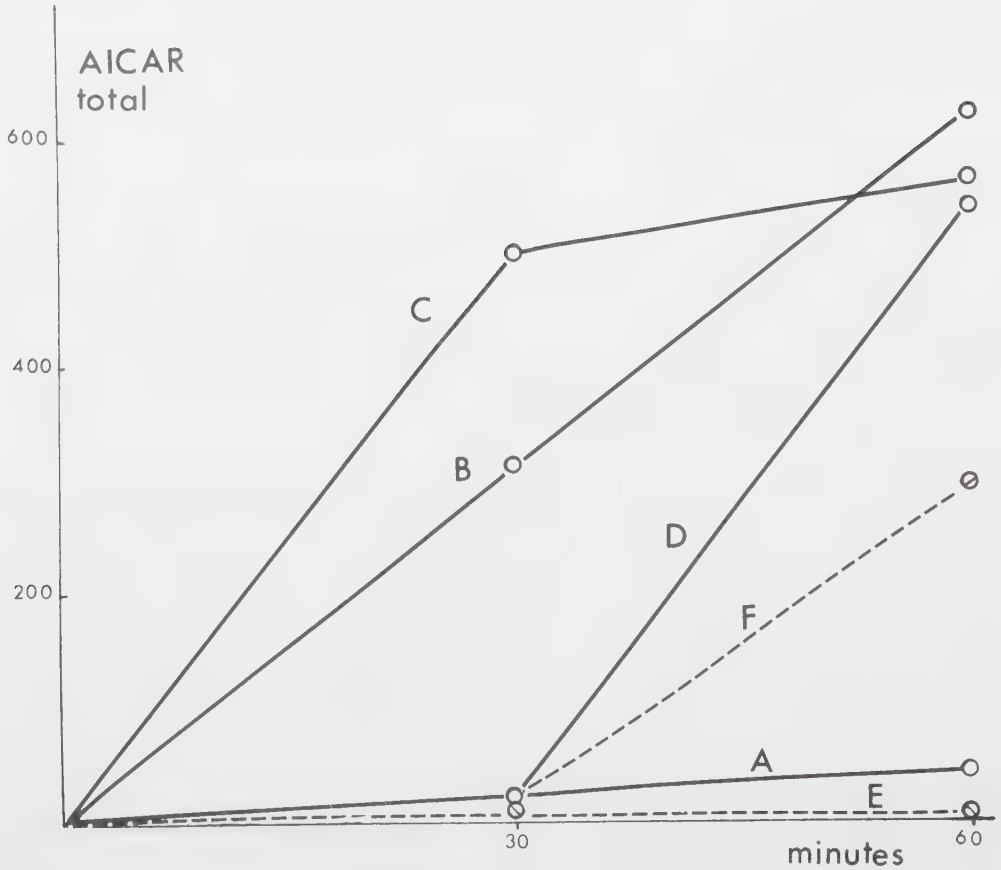


FIGURE 32

Formation d'AICAR par un extrait acellulaire de levure. Mise en évidence de l'accumulation par un extrait inactif d'un composé "X" susceptible d'être transformé en AICAR par un produit actif même en présence d'histidine

Pour les conditions, voir figure 28.

A : extrait inactif seul ; B : extrait actif seul ; C : mélange des deux extraits au temps zéro ; D : addition à 30 min. de l'extrait actif à l'extrait inactif présent depuis le temps zéro ; E : mêmes conditions que A, B et C avec histidine ajoutée à 30 min.

extraits, qu'ils soient mélangés ou non (courbe E). Quand le système est incubé pendant 30 minutes avec l'extrait inactif, puis lorsque l'on ajoute l'histidine, et ensuite l'extrait actif, celui-ci est capable de former des arylamines à partir d'un composé " X " accumulé par l'extrait inactif (Courbe F) . La quantité d'arylamine formée est la même que celle formée par l'extrait actif tout seul ajouté au temps 0 (courbe B) .

Ces expériences peuvent s'expliquer aisément avec le schéma suivant :

$$PRPP + ATP \xrightarrow[\uparrow\ \text{histidine}]{E_1} \text{" X "} \xrightarrow{E_2} \text{" III "} \xrightarrow{E_3} AICAR + IGP$$

En admettant, pour simplifier le raisonnement, que la différence entre l'extrait actif et l'extrait inactif réside seulement dans le complexe enzymatique E_2 , la préincubation du système avec l'extrait inactif conduit à l'accumulation du composé " X " qui peut être transformé en AICAR par l'extrait actif en présence ou en absence d'histidine.

Ce schéma a été confirmé par AMES, MARTIN et GARRY (1961) chez S. thyphimurium . Le composé "X" est le PR-ATP, seul composé ne donnant pas la réaction de BRATTON et MARSHALL après hydrolyse acide.

L'addition en cours de réaction à un complexe enzymatique d'un inhibiteur de son activité s'avère donc une technique permettant la découverte d'étapes nouvelles dans une chaîne de biosynthèse.

V - DEUXIEME PARTIE - ETUDE DE LA REPRESSION DE LA BIOSYNTHESE DE L'HISTIDINOL PHOSPHATE PHOSPHATASE ET DE L'HISTIDINOL DESHYDROGENASE CHEZ LA LEVURE .

A - Introduction .

Afin d'obtenir des renseignements sur la régulation de la biosynthèse des enzymes de la chaîne biosynthétique de l'histidine, nous avons choisi deux d'entre eux, l'histidinol phosphate phosphatase et l'histidinol deshydrogénase. En effet, le complexe multienzymatique décrit dans la première partie de ce chapître se prête mal à ce genre d'étude.

B - Matériel et méthodes

Nous ne ferons ici qu'apporter quelques compléments à ce qui a été dit dans le paragraphe analogue de la première partie.

1 . Produits chimiques

L'histidinol-phosphate a été aimablement fourni par le Dr AMES ; les autres produits sont des produits commerciaux. L'histidinol provient des laboratoires HACO (Berne, Suisse), le INT des laboratoires DAJAC (Philadelphie, USA).

2. Souches .

Nous avons utilisé des souches haploïdes soit sauvages, soit exigeant l'histidine. Ces dernières proviennent du laboratoire du Dr MORTIMER. Souvent, ces souches avaient de nombreuses exigences biochimiques en plus du besoin en histidine. Elles ont été croisées avec une même souche sauvage ; après sporulation de la souche diploïde issue de ce croisement, des souches haploïdes avec le seul besoin en histidine ont été obtenues à partir des spores isolées soit en masse, soit par analyse de tétrades. Nous avons ainsi isolé des souches qui exigent seulement l'histidine, correspondantes aux sept loci indépendants connus : hi1, hi2, hi5, hi6, hi7, hi8, hi9. Leur nomenclature est consignée dans le chapître I. La souche sauvage utilisée aussi bien pour les croisements que pour les essais enzymatiques était la D273-10B.

3. Cultures .

Dans le cas de la souche sauvage, la levure est ensemencée, à partir d'une préculture en milieu complet, dans le milieu minimal (GO) contenant ou ne contenant pas 100 mg/l d'histidine. L'ensemencement est tel qu'au bout de 18 heures d'incubation à 25°C d'un litre de milieu contenu dans des fioles à toxine, avec une bonne agitation, la culture se trouve en fin de phase logarithmique. Quant aux souches mutantes, un quart de la culture faite en milieu contenant de l'histidine est lavé stérilement avec du milieu minimal, réensemencé dans du GO (mêmes conditions que précédemment) et, incubé pendant 48 heures à 25°C, ceci dans le but de carencer la culture en histidine. La récolte des cellules se fait à froid par centrifugation ; le culot est lavé à l'eau distillée et gardé à 0°C sous 4 ml d'eau distillée.

4. Broyage

Nous avons utilisé un broyeur Nossal, toutes les opérations étaient effectuées à 0°C selon la technique décrite par SOMLO (1965). Pour 200 à 400 mg de poids sec de levure dans un volume final de 8 ml de tampon TRIS 0,05 M, pH 8,7, on ajoute 8 g. de billes de verre et de l'histidinol à la concentration finale de 2×10^{-5}M, afin de stabiliser l'enzyme, comme on le verra plus loin. Le temps de broyage est de deux fois 30 sec. avec un temps d'arrêt de quelques minutes.

5. Obtention de l'extrait .

Le broyat est centrifugé à 0°C pendant 20 min. à 25 000 g. Cet extrait brut

(Eb) est utilisé comme tel pour les essais enzymatiques, ou, le plus souvent, il est passé par une colonne de Séphadex 50 (PORATH, 1960) pour en séparer en grande partie les petites molécules. (La colonne est préalablement équilibrée avec du tampon TRIS 0,01 M, pH 8,9 et étalonnée avec une solution d'hémoglobine). L'extrait ainsi obtenu (Es) contient en général de 5 à 10 mg de protéines par ml, dosées par la méthode au biuret. Après passage sur la colonne de Séphadex, de l'histidinol à la concentration finale de 2×10^{-5} est ajouté à l'extrait. Les dosages enzymatiques sont effectués dans la journée même.

6. Détermination de l'activité enzymatique .

a) Phosphatase : l'activité enzymatique a été déterminée par la méthode de AMES (1956) légèrement modifiée.

Le milieu d'incubation contient 0,2 ml de tampon glycine 0,2 M, pH 9, BeS04 10^{-3}M (pour inhiber les phosphatases non spécifiques), de l'extrait enzymatique (environ 0,5 mg de protéines), dans un volume final de 0,38 ml. La réaction est déclenchée par l'addition de 0,02 ml d'histidinol phosphate 0,1 M et après 10 minutes d'incubation à 30°C elle est arrêtée par l'addition d'acide trichloroacétique (concentration finale 5 %). Après centrifugation le phosphate inorganique est déterminé dans le surnageant par la méthode de SUMNER (1944). Pour le témoin nous procédons de la même façon en ajoutant 0,02 ml d'eau à la place du substrat. L'activité enzymatique est proportionnelle à la quantité d'extrait ajoutée (figure 33). L'activité spécifique est exprimée en mμmoles de phosphate inorganique (Pi) produit par minute et par milligramme de protéine de l'extrait.

b) Deshydrogenase

L'activité enzymatique a été déterminée par la méthode de AMES, HARTMAN et JACOB (1963) légèrement modifiée.

Le milieu d'incubation contient 0,2 ml de tampon TRIS 0,15 M, pH 8,9, 0,2 ml du mélange de colorants, l'extrait enzymatique (environ 0,1-0,2 mg de protéines), le tout dans un volume final de 0,52 ml. Le mélange de colorants contient 0,5 ml de DPN (20 mg/ml), 0,5 ml de gélatine (0,2 %), 0,5 ml de phénazine méthasulfate (0,4 mg/ml) et 2,5 ml de INT (3,2 mg/ml). Le mélange est fait extemporanément et il est gardé protégé de la lumière dans un bain de glace. La réaction est déclenchée par l'addition de 0,02 ml d'histidinol 10 mM, et après incubation pendant 20 min. à 30°C, elle est arrêtée par l'addition de 0,1 ml de HCl 0,1N. Pour le témoin, nous procédons de la même façon en ajoutant 0,02 ml d'eau distillée à la place du substrat. La densité optique est mesurée avec un spectrophotomètre Beckmann à 520 mμ. A l'aide d'une courbe étalon établie avec une solution de DPNH (qui remplace le DPN, plus l'extrait enzymatique), il est possible de calculer la quantité d'histidinol transformée en histidine, puisqu'une molécule d'histidinol correspond à deux molécules de DPNH.

histidinol + 2 DPN ⟶ histidine + 2 DPNH

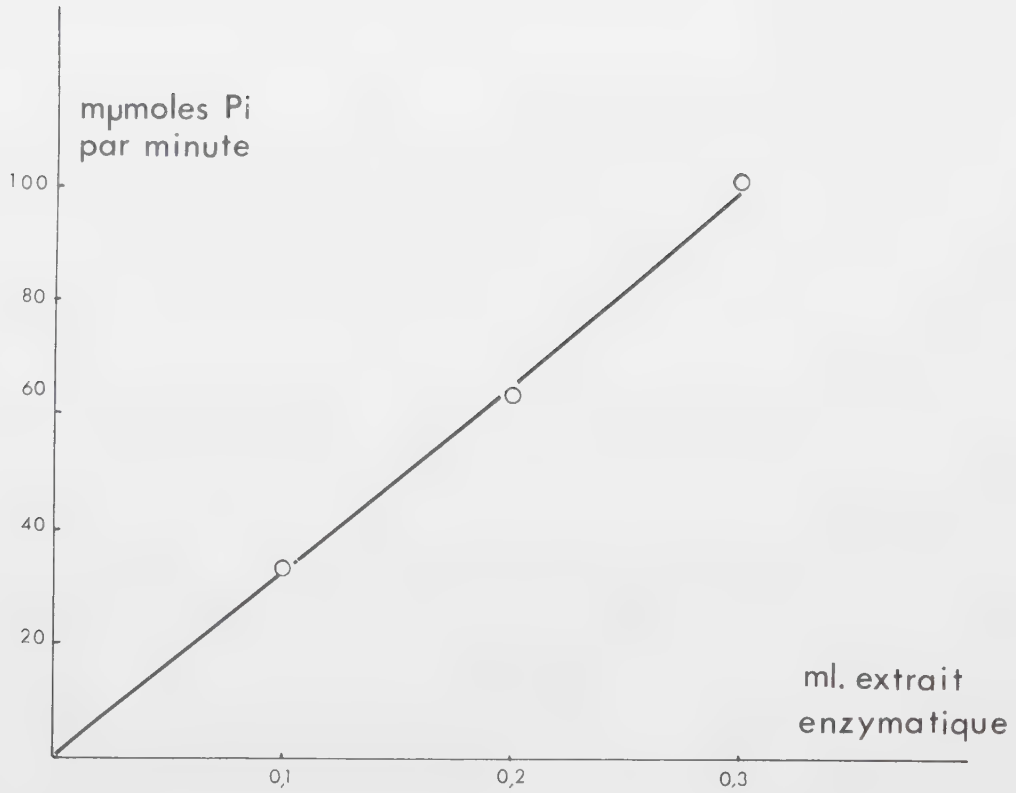


FIGURE 33

Dosage de l'histidinol phosphate phosphatase : proportionnalité entre le phosphate inorganique (Pi) produit et la quantité d'extrait enzymatique ajoutée

Pour les conditions, voir le texte.

Une précaution importante est à prendre : protéger les tubes d'incubation du rayonnement solaire direct, car la phénazine méthasulfate est photosensible.

L'activité spécifique est exprimée en mμmoles d'histidinol transformés par min. et par milligramme de protéine de l'extrait enzymatique, l'activité étant proportionnelle à la quantité d'extrait ajoutée (figure 34) .

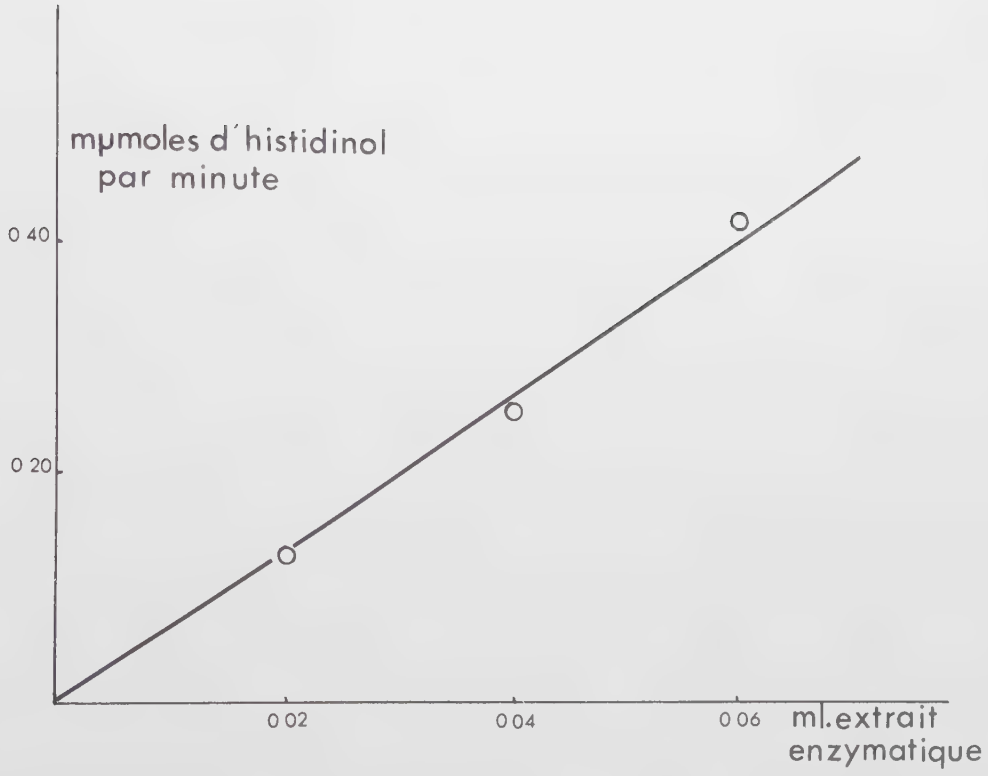


FIGURE 34

Dosage de l'histidinol deshydrogénase : proportionnalité entre l'histidinol transformé et la quantité d'extrait enzymatique ajoutée

L'activité enzymatique d'un extrait, après passage par colonne de Séphadex , diminue rapidement au cours du temps. L'histidinol à une concentration finale de $2,5 \times 10^{-5}$M protège contre cette inactivation. Pour cette raison tous nos extraits enzymatiques étaient préparés en présence d'histidinol et celui-ci ajouté à l'extrait après passage par colonne de Séphadex. L'histidinol présent en tant que stabilisateur de l'extrait ne contribue que pour moins de 1 % à saturer la réaction.

c.) Résultats

Les activités spécifiques sont assez variables d'une expérience à l'autre, beaucoup plus pour la deshydrogénase que pour la phosphatase. Ceci est probablement dû à la méthode de dosage, car le mélange de colorants utilisé pour le dosage de la deshydrogénase, bien que préparé avant chaque expérience, est très instable. Malgré cet inconvénient, les résultats sont significatifs, comme on le verra plus loin.

Nous avons toujours comparé l'activité spécifique d'un extrait enzymatique provenant de la même souche cultivée dans deux conditions différentes. Tout d'abord, nous avons essayé de préciser si, chez la souche sauvage, les deux enzymes sont réprimés par l'histidine exogène. Les extraits enzymatiques provenant de la souche sauvage cultivée soit en présence d'histidine, soit en son absence, montrent des activités spécifiques assez semblables aussi bien pour la phosphatase que pour la deshydrogénase (Tableau 14)

TABLEAU N° 14

Activité spécifique de l'histidinol-phosphate phosphatase et de l'histidinol deshydrogénase des extraits enzymatiques de la souche sauvage cultivée dans différentes conditions . Dosages effectués sur extraits passés par colonne de Séphadex .

SOUCHE	N° Exp.	PHOSPHATASE		DESHYDROGENASE	
		Conditions de culture		Conditions de culture	
		His	Min	His	Min
D 273-10 B	E 2	74	57	-	-
	E 11	-	-	0,59	0,73
	E 19	-	-	0,53	0,51

Etant donné que l'histidine dans le milieu de culture ne provoque pas de répression des deux enzymes dosés, nous avons essayé de mettre en évidence une éventuelle augmentation de l'activité spécifique de ces deux enzymes.

Pour cela nous avons cultivé des souches qui exigent l'histidine dans du milieu contenant cet acide aminé ; une partie aliquote de chaque culture est lavée et cultivée dans du milieu minimal dans le but de la carencer en histidine. Pour déterminer le temps de culture en milieu minimal donnant une augmentation sensible de l'activité spécifique d'un enzyme, nous avons effectué une cinétique de carence, en prélevant des échantillons à des temps successifs. Le tableau 15 montre les résultats des dosages de la phosphatase pour la souche hi7, cultivée en milieu minimal pendant des temps de plus en plus longs.

Ces résultats montrent qu'il est nécessaire de carencer assez longtemps les souches exigeant l'histidine : nos expériences ont été réalisées généralement avec des carences de 48 heures.

TABLEAU N° 15

Activité spécifique de l'histidinol-phosphate phosphatase des extraits enzymatiques de la souche hi 7, prélevée à des temps successifs au cours de la carence en histidine .

SOUCHE		MODE DE CULTURE			
	Milieu hist.	Temps en milieu minimal			
		11 h.	22 h.	33 h.	48 h.
197-4D (hi 7)	82	66	117	115	140

TABLEAU N° 16

Activité spécifique de l'histidinol - phosphate phosphatase et de l'histidinol deshydrogénase des extraits enzymatiques de différentes souches cultivées ou carencées en histidine. Dosages effectués sur extraits passés par colonne de Séphadex, (x) : extraits bruts).

SOUCHES	N° exp.	PHOSPHATASE			DESHYDROGENASE		
		Conditions de culture		Mesure de la dérépression	Conditions de culture		Mesure de la dérépression
		his	min		his	min	
191-4A (hi1)	E 11	74	74	1	1,19	3,22	2,7
	E 18	-	-	-	0,67	2,31	3,4
192-4B (hi2)	E 11	10	1	0,1	2,42	7,22	3,0
	E 18	-	-	-	0,63	3,76	3,0
195-4C (hi5)	E 11	95	112	1,18	0,78	3,61	4,6
	E 19	-	-	-	0,71	3,48	4,9
196-2 (hi6)	E 16	52	48	0,92	0,32	1,10	3,4
197-4D (hi7)	E 7	82	140	1,7	-	-	-
	E 13 (x)	-	-	-	0,90	16	17,8
	E 8	-	-	-	1,94	10	5,1
	E 8 (x)	-	-	-	2,4	12,7	5,3
	E 19	-	-	-	2,45	9,9	4,0
198-4D (hi8)	E 16	69	44	0,64	0,84	-	-
199-2C (hi9)	E 17	80	111	1,4	0,09	-	-

Note : les variations d'activité spécifique de 7 unités pour la phosphatase et de 0,06 unités pour la deshydrogénase ne sont pas significatives .

Le tableau 16 résume les résultats expérimentaux,exprimés en activités spécifiques. Notons que la précision de nos déterminations de densité optique ne dépasse pas 0,01 unité ; ce qui, dans les conditions de nos expériences, correspond à 7 unités d'activité spécifique pour la phosphatase et à 0,06 unité d'activité spécifique pour la deshydrogénase.

Les souches portant les gènes hi$_1$, hi5, hi6, hi7, hi8, et hi9 présentent une activité spécifique de la phosphatase 5 à 10 fois supérieure à celle de la souche hi2. Etant donné la précision des mesures, il résulte donc que la mutation hi2 conduit à la déficience en histidinol-phosphate phosphatase. Toutes les souches, sauf hi9, présentent une activité spécifique de la deshydrogénase 7 à 20 fois supérieure à cette dernière, et vu la marge d'erreur de la mesure, on peut conclure que la mutation hi9 conduit à la déficience en histidinol deshydrogenase .

Quelles autres conclusions peut-on dégager du tableau 16. La dérépression pour la phosphatase est très faible ou nulle pour toutes les souches étudiées. Par contre, pour la deshydrogénase, les résultats sont très différents : la dérépression est considérable. Le rapport des activités spécifiques des extraits enzymatiques des souches, soit carencées, soit cultivées en histidine, varie entre 3 et 17. Etant donné le faible nombre d'expériences réalisées les résultats obtenus ne peuvent être que qualitatifs. Bien que l'activité spécifique varie beaucoup d'une expérience à l'autre, elle est toujours plus grande lorsque les souches sont carencées en histidine.

Nous avons dosé également les deux enzymes dans un extrait enzymatique de la souche ad3 qui, rappelons-le, exige pour sa croissance l'adénine et l'histidine. La souche a été carencée soit pour l'adénine, soit pour l'histidine, soit pour les deux métabolites à la fois. Pour cela, elle a été cultivée en présence d'adénine et d'histidine ; en fin de phase logarithmique, des parties aliquotes ont été ensemencées en trois milieux différents, minimal, minimal plus adénine ou minimal plus histidine. Les cellules sont récoltées au bout de 31 heures. Le tableau 17 montre les résultats obtenus. Le besoin en histidine des souches ad3 n'est pas dû à l'absence de l'histidinol-phosphate phosphatase ou de l'histidinol deshydrogénase.

Il était intéressant aussi de doser les deux enzymes dans un extrait d'une souche ad3 portant un mero-suppresseur externe. La souche a d'abord été cultivée en présence d'adénine et d'histidine : des parties aliquotes ont été ensemencées en deux milieux différents : minimal plus histidine et minimal plus adénine.

Le tableau 18 montre les résultats obtenus. Ainsi quand la souche est cultivée en milieu contenant de l'histidine, le niveau de la deshydrogénase est bas, comme on doit s'y attendre. Par contre, quand la souche est cultivée en milieu contenant seulement de l'adénine, le niveau de l'enzyme est trois fois plus élevé.

L'histidine endogène n'est donc pas suffisante pour réprimer la deshydrogénase Ceci est un argument important pour rendre compte de l'inhibition de la conversion génique du gène ad3 par le suppresseur externe, comme nous l'avons déjà vu. (Ch. III).

D. Conclusion

Nous avons pu mettre en évidence que les niveaux d'histidinol-phosphate phosphatase et d'histidinol deshydrogénase sont toujours relativement bas chez une souche sauvage de levure, qu'elle soit cultivée en présence ou en absence d'histidine.

Ceci implique que la souche se trouve en état de répression pour ces deux enzymes. On peut obtenir une augmentation du niveau de base pour la deshydrogénase, mais pas pour la phosphatase, si on carence en histidine des souches exigeant cet acide aminé. En d'autres termes nous pouvons obtenir un état de dérépression pour la deshydrogénase chez la levure.

En plus, les loci hi2 et hi9 correspondent à l'absence de phosphatase et de deshydrogénase respectivement.

TABLEAU N° 17

Activité spécifique de l'histidinol-phosphate phosphatase et de l'histidinol deshydrogenase des extraits enzymatiques de la souche ad3, soit cultivée en adenine plus histidine, soit carencée en milieu histidine, adénine ou minimal. Dosages effectués sur extraits passés par colonne de Séphadex.

SOUCHE	N° exp.	PHOSPHATASE				DESHYDROGENASE			
		Conditions de culture				Conditions de culture			
		ade + his	his	ade	min	ade + his	his	ade	min
264-6D (ad3)	E 13	76	71	72	89	1,86	1,43	2,96	2,11

TABLEAU N° 18

Activité spécifique de l' histidinol-phosphate phosphatase et de l'histidinol deshydrogénase des extraits enzymatiques d'une souche ad3 s_{21}-hi cultivée dans les conditions consignées dans le tableau. Dosages effectués sur extraits passés par colonne de Séphadex.

SOUCHE	N° exp.	PHOSPHATASE			DESHYDROGENASE		
		Conditions de culture			Conditions de culture		
		ade + his	his	ade	ade + his	his	ade
403-9C ad3 s_{21}-hi	E 14	78	32	35	1,90	1,72	6,47

VI - DISCUSSION

Dans ce chapître, nous avons étudié quelques aspects de la biosynthèse de l'histidine ainsi que les mécanismes de régulation de cette voie biosynthétique chez la levure.

La biosynthèse de l'histidine est très vraisemblablement la même chez la levure que chez les autres microorganismes. Résumons nos arguments : la partie cyclique de cette biosynthèse existe chez la levure, car des extraits enzymatiques forment de l'AICAR à partir de R5P, ATP et des autres cofacteurs nécessaires à la série des réactions. Cette série de réactions est rétroinhibée par l'histidine. En utilisant une technique d'inhibition en cours de réaction, nous avons pu mettre en évidence l'accumulation d'un produit " X ", qui même en présence d'histidine, peut être transformé enzymatiquement en AICAR. Par contre, il ne doit pas se transformer en AICAR par une faible hydrolyse acide. Ce produit est vraisemblablement le PR-ATP, seul intermédiaire dans les premières étapes de la biosynthèse de l'histidine qui possède cette dernière caractéristique. Par ailleurs le mutant $\underline{hi}_1$ chez la levure est bloqué au niveau du premier enzyme de la chaîne, la PR-ATP pyrophosphorylase (KLOPOTOWSKI, T., communication personnelle). Nous avons vu aussi que les mutants $\underline{hi}_2$ et $\underline{hi}9$ sont bloqués respectivement au niveau de la phosphatase et de la deshydrogénase.

Trois mutants biochimiques bloqués au début et à la fin de la chaîne de biosynthèse, l'analogie dans une partie de cette biosynthèse et la rétroinhibition par l'histidine nous paraissent des arguments suffisants pour conclure à la similitude, sinon à l'identité, entre les bactéries et la levure en ce qui concerne la biosynthèse de l'histidine.

Tout récemment notre travail a été entièrement confirmé par FINK (1964). Il a mis en évidence la correspondance entre tous les gènes his^- (sauf $\underline{ad}3$) chez la levure et les points de coupure dans la chaîne métabolique. Ces résultats, résumés dans la figure 35, comparent les différents gènes his^- chez Neurospora, Salmonella et levure. Remarquons que le gène $\underline{hi}4$ est dans le même groupe de complémentation que le gène $\underline{hi}9$ (MORTIMER dans VON BORSTEL, 1963), qui, comme nous l'avons vu, ne possède pas la deshydrogénase.

Par contre, nous savons peu de choses sur la biosynthèse de l'adénine. Les mutants $\underline{ad}_1$ et $\underline{ad}2$ chez la levure accumulent de l'AIR en donnant un pigment rouge. Ce pigment ne s'accumule que lorsque les souches sont carencées en adénine ; par ailleurs BURNS (1964) a montré que l'inhibiteur physiologique de l'accumulation de l'AIR n'est pas l'adénine mais l'IMP.

Mais si la biosynthèse de l'adénine est différente chez la levure et chez d'autres microorganismes, l'adénine reste le précurseur de l'histidine car l'ATP est le substrat du premier enzyme de la chaîne.

Pour faciliter la suite de notre discussion nous admettrons que la biosynthèse de l'adénine et de l'histidine se font par les mêmes voies chez la levure que chez les autres

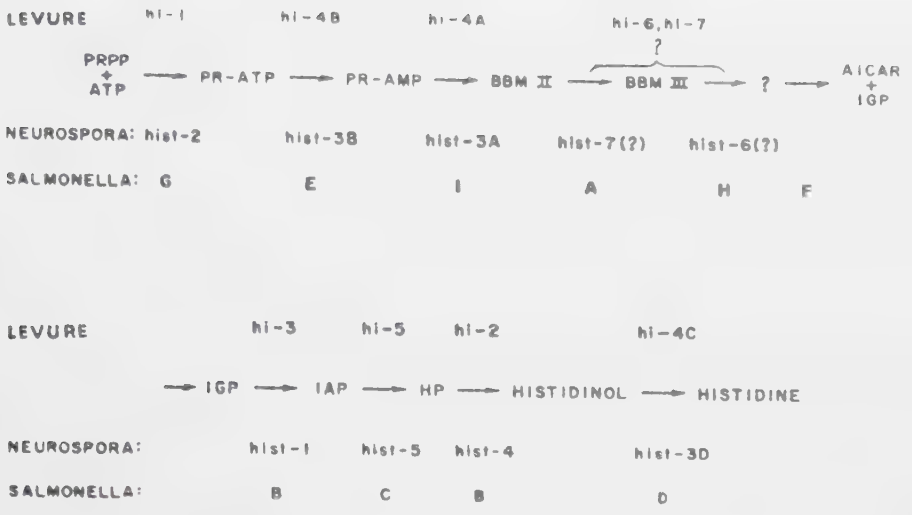


FIGURE 35

Correspondance entre les mutations et les déficiences enzymatiques dans la biosynthèse de l'histidine chez la levure, Neurospora et Salmonella (d'après FINCK, 1964)

organismes. La même voie de biosynthèse ne signifie pas forcément que toutes les étapes sont identiques.

Il nous paraît intéressant de rappeler maintenant le principe de sélection utilisé par ROMAN (1956b) pour isoler les souches ad3. Les souches haploïdes ad1 ou ad2 sont cultivées en milieu naturel non supplémenté en adénine (YPG) avec une bonne aération. On fait des repiquages successifs et un certain nombre de colonies blanches apparaissent lors de l'étalement de la population sur du milieu complet. Ces colonies sont de trois types : a) mutants reverses ; b) mutants "petite colonie", car dans certaines conditions de croissance ces mutants ne produisent pas de pigment rouge (TAVLITZKI, 1951) ; c) mutants ayant le même phénotype que la souche de départ. L'analyse génétique a montré que ce dernier type de mutant est dû à l'apparition d'une nouvelle mutation conduisant aussi au besoin en adénine. Le génotype des souches ainsi isolées est donc ad1, adx, ou ad2 adx. Par croisement avec des souches prototrophes et par analyse des tétrades, il est facile d'isoler des souches adx. ROMAN a pu ainsi mettre en évidence six loci indépendants contrôlant la biosynthèse de l'adénine : ad3, ad4, ad5, ad6, ad7 et ad8. Seul ad3 contrôle à la fois la biosynthèse de l'adénine et de l'histidine.

Vraisemblablement, le bloc génétique correspondant à adl et ad2 se trouve après AIR. Dans ce cas, du fait que les souches ad3 ad2 ou ad3 adl n'accumulent pas de pigment rouge, le bloc génétique correspondant à ad3 pour la biosynthèse de l'adénine devrait se trouver entre PRPP et AIR.

Connaît-on des mutations du même genre chez d'autres organismes ?

Chez les bactéries on n'en connaît pas. Par contre, chez certains champignons il y a des mutations semblables, dont le phénotype est une double exigence en adénine et histidine. Les mutants ad9 chez Schizosaccharomyces pombe (HESLOT, communication personnelle) et les mutants adl, ad2 et ad9 chez Coprinus radiatus (PREVOST, 1962), sont de de type. Ces trois dernières mutations appartiennent au même locus (GANS M., communication personnelle). Chez d'autres champignons ou des mutations biochimiques concernant l'adénine ou l'histidine sont connues, tels que Neurospora ou Aspergillus, des mutants ayant cette double exigence n'ont jamais été isolés.

SHEDLOVSKY et MAGASANIK (1962a, 1962b) ont décrit chez E. coli un mutant qui exige soit l'adénine, soit l'histidine. Sa croissance est normale en présence d'histidine, moins bonne en présence d'adénine, très faible en milieu minimal quand la préculture est faite en présence d'adénine, et presque nulle quand la préculture est faite en présence d'histidine. Le point de coupure partiel de ce mutant se trouve avant IGP et les auteurs expliquent son comportement par des niveaux non balancés des différents enzymes.

Nous pouvons énoncer maintenant un certain nombre d'hypothèses qui rendraient compte de la mutation ad3 chez la levure .

La méthode de sélection utilisée pour l'isolement du mutant implique que son point de coupure dans la biosynthèse de l'adénine doit se trouver avant AIR. Si la mutation ad3 correspond à un seul gène de structure gouvernant la formation d'une seule protéine, trois hypothèses sont possibles :

Ière hypothèse : deux activités enzymatiques, l'une dans la voie biosynthétique de l'adénine, l'autre dans celle de l'histidine, seraient gouvernées par le même gène de structure. On connaît chez les microorganismes des situations de ce genre. La mutation ad12 chez Salmonella (GOTS et GOLLUB, 1957) et la mutation ad4 chez Neurospora (GILES, 1958) correspondent à l'absence de l'adénylosuccinase qui catalyse deux étapes différentes dans la biosynthèse de l'adénine : le passage SAICAR $\longrightarrow$ AICAR et le passage adénylosuccinate ribotide $\longrightarrow$ AMP. Ces deux étapes sont très semblables du point de vue chimique. La mutations his-B chez S. thyphimurium correspond à l'absence de deux activités enzymatiques, IGP-deshydrase et histidinol-phosphate phosphatase.

Dans les deux exemples cités, ces mutations conduisent à une seule exigence,

car elles gouvernent deux étapes d'une même voie biosynthétique. Pour ad3 il faudrait qu'une étape dans la biosynthèse de l'adénine et une étape dans la biosynthèse de l'histidine soient gouvernées par le même gène de structure.

La seule étape dans la biosynthèse de l'histidine pour laquelle on ne connaît pas de mutants chez la levure, est située juste avant IGP (figure 35). Les mutants hiF chez Salmonella sont bloqués à ce niveau, mais on ne sait pas si la formation de AICAR et IGP se fait à la suite d'une seule réaction enzymatique, ou si l'AICAR est libéré avant l'IGP. Puisque nous savons que les extraits acellulaires des souches ad3 produisent l'AICAR, cette première hypothèse pourrait être mise à l'épreuve en déterminant si la formation d'AICAR est accompagnée de la formation d'IGP.

2ème hypothèse : le produit intermédiaire accumulé du fait du point de coupure dans la biosynthèse de l'adénine, inhiberait l'activité ou la biosynthèse d'un enzyme dans la chaîne biosynthétique de l'histidine. Pour que la souche exige à la fois l'adénine et l'histidine, l'adénine dans le milieu de culture ne devrait pas empêcher l'accumulation du produit inhibiteur. La déficience correspondant à ad3 devrait donc être située au début de la chaîne de biosynthèse de l'adénine.

Il nous paraît difficile d'admettre que le blocage se trouve au niveau du premier enzyme, car le produit intermédiaire accumulé serait le PRPP. Et si celui-ci inhibait un enzyme de la chaîne de l'histidine, des mutations dans d'autres voies métaboliques où le PRPP est impliqué, conduiraient à une exigence simultanée en histidine. Si le blocage se trouve au niveau de tout autre enzyme sauf le premier, on peut constituer des mutants doubles ad3 adx, et une de ces souches devraient exiger seulement l'adénine, lorsque adx serait bloqué au niveau du premier enzyme. Il n'y aurait alors plus d'accumulation du produit intermédiaire inhibiteur d'un enzyme dans la chaîne de l'histidine. L'expérience a été réalisée au laboratoire par GORMAN, J.A. (communication personnelle) et tous les doubles mutants ad3 ad4, ad3 ad5, ad3 ad6, ad3 ad7 et ad3 ad8 exigent toujours l'histidine. Rappelons que toutes ces mutations doivent être bloquées avant AIR, vu leur mode de sélection. La deuxième hypothèse ne serait donc pas à retenir. Une hypothèse symétrique qui postulerait un point de coupure primaire dans la biosynthèse de l'histidine avec l'action inhibitrice sur la chaîne de l'adénine par un métabolite accumulé, a pu être rejetée de la même manière : les souches hi_1 ad3 exigent toujours l'adénine.

3ème hypothèse : Il existe un enzyme en commun dans la biosynthèse de l'adénine et de l'histidine : la phosphorybosil pyrophosphate kinase, enzyme qui catalyse la réaction ATP + R5P $\longrightarrow$ PRPP + AMP . Mais cet enzyme n'est pas commun seulement aux biosynthèses de l'adénine et de l'histidine, mais aussi à celles du tryptophane et de l'uracile. En plus le PRPP est nécessaire à l'utilisation de l'adénine par la cellule, pour former de l'AMP. Pour qu'une souche manquant de PRPP-kinase montre seulement la double exigence en

adénine et en histidine, il faudrait admettre l'existence, à la fois, d'un système de compartimentation dans la cellule et d'un autre enzyme catalysant la même réaction. Le PRPP formé par ce dernier enzyme ne serait pas accessible pour la biosynthèse de l'adénine et de l'histidine. Un cas similaire est connu chez Neurospora : le carbamyl phosphate est nécessaire à la biosynthèse de l'arginine et de l'uracile. Or, on connait des mutants arg$^-$ ou ura$^-$ qui manquent de carbamyl phosphate kinase. Il y a donc deux enzymes dans la cellule, et le produit formé par l'un d'eux n'est pas accessible à l'autre chaîne de biosynthèse (DAVIS et WOODWARD, 1962).

Il y aurait un moyen expérimental pour mettre à l'épreuve cette hypothèse. Il faudrait réaliser des expériences "in vivo" pour montrer l'absence ou la présence de la PRPP-kinase chez les souches ad3, car des expériences sur des extraits acellulaires n'auraient aucune signification puisque l'on détruirait la compartimentation. Voici l'expérience que l'on pourrait envisager : une souche ad3 hi4B, incubée en présence d'adénine-C^{14} devrait accumuler du PR-ATP marqué (voir figure 35), si le PRPP est synthétisé "in vivo". Par contre, si la PRPP-kinase est absente, on ne devrait pas trouver du PR-ATP marqué.

Les trois hypothèses que nous venons d'énoncer correspondent à des aspects différents de la même idée : ad3 serait un gène de structure. On peut envisager une autre possibilité : ad3 serait un gène de type opérateur .

4ème hypothèse : si deux gènes de structure, l'un concernant l'adénine, l'autre concernant l'histidine, se trouvent intimement liés sur le chromosome et constituent un opéron (JACOB et MONOD, 1961a), on peut envisager une mutation unique pléiotrope du type opérateur moins.

Les mutations de ce type sont connues pour différents opérons. Chez S. thyphimurium, la mutation G-203 conduit à l'absence de tous les enzymes de l'opéron histidine, (AMES, HARTMAN et JACOB, 1963). Chez E.coli, les différentes mutations 0° ($0°_{84}$, $0°_{118}$, $0°_{2}$ etc ...) conduisent à l'absence de tous les enzymes de l'opéron lactose.

Il est intéressant de rappeler ici que l'on connaît des gènes suppresseurs de ces gènes opérateurs (BECKWITH, 1963, 1964a, 1964b). Certains de ces suppresseurs restaurent seulement l'activité perméase, d'autres restaurent partiellement l'activité perméase et β-galactosidase à la fois, aucun ne restaure l'activité β-galactosidase seulement. Ceci est une analogie frappante avec les mero-suppresseurs que nous avons décrits dans le chapître précédent, qui rétablissent seulement la fonction histidine du gène ad3.

Il existe chez la levure plusieurs exemples de gènes pléîotropes : le mutant ga4 (DOUGLAS et HAWTHORNE, 1964) qui conduit à l'absence de trois enzymes du métabolisme du galactose, les mutants p_1 et p_7 qui conduisent à l'absence de la cytochrome oxydase et de la succino-cytochrome C-réductase (SHERMAN et SLONIMSKI, 1964), le mutant hi4ABC (FINK, 1964) qui conduit à l'absence de la PR-AMP pyrophosphorylase, la PR-AMP hydrolase et de l'histidinol deshydrogénase. Dans le premier cas, les trois enzymes du métabolisme du galactose sont gouvernés par trois gènes de structure intimement liés sur le chromosome mais le gène ga4 n'est pas lié aux trois précédents. Dans le deuxième cas les deux gènes ne sont pas liés. Dans le troisième cas, les gènes hi4B, hi4A et hi4C ainsi que le gène hi4ABC, sont localisés dans une même région étroite du chromosome : hi-4ABC serait donc le gène opérateur de l'opéron hi4.

L'hypothèse du gène opérateur pour expliquer la mutation ad3 pourrait être mise à l'épreuve. On devrait pouvoir isoler des mutants exigeant soit l'adénine, soit l'histidine, qui seraient allèles d'ad3 .

Cette dernière hypothèse est la plus séduisante de toutes, comme nous le verrons au cours de la discussion générale , elle rend compte de la plupart des résultats expérimentaux décrits dans ce mémoire.

Il est bien évident que la détermination de la déficience biochimique correspondant à ad3, est certainement le problème le plus important qui reste à résoudre dans le cadre du phénomène que nous avons étudié.

DISCUSSION GENERALE

A - Le travail que nous venons d'exposer comporte trois parties bien distinctes ; elles concernent :

1) l'inhibition par l'histidine de la recombinaison au locus ad3 chez la levure,
2) la suppression de ce même évènement génétique par des suppresseurs externes au locus, et
3) l'étude de la biosynthèse et de la régulation de la biosynthèse de l'adénine et de l'histidine.

A la fin de chaque chapître, et en particulier à la fin du deuxième et du troisième, qui constituent la principale contribution originale de ce mémoire, nous avons discuté exhaustivement des faits, du point de vue phénoménologique. Ceci aurait pu paraître suffisant. Néanmoins, il n'est pas dépourvu d'intérêt d'essayer d'intégrer le phénomène étudié dans un cadre plus général. Pour le faire, au cours de cette discussion, nous ferons appel aux connaissances sur la recombinaison et sur la régulation de la synthèse des protéines, qui ne découlent pas de notre propre travail.

Le mécanisme qui est à la base de l'évènement génétique étudié, est une recombinaison mitotique intragénique, dont la caractéristique principale est d'être non réciproque.

La conversion génique est un phénomène qui a été souvent décrit chez des Ascomycètes, (voir ROMAN, 1963) ; il a été étudié surtout pendant la méiose. La levure, ayant une phase diploïde stable, s'est prêtée particulièrement à l'étude comparative de la conversion génique mitotique et méiotique (ROMAN, 1956a).

Plusieurs modèles rendant compte de ce mécanisme de recombinaison ont été proposés : l'erreur de copie (LEDERBERG, 1955 ; FREESE, 1957), les régions d'appariement efficace (PRITCHARD, 1960), le polaron (LISSOUBA, MOUSSEAU, RIZET et ROSSIGNOL, 1962), le polaron modifié (STADLER et TOWE, 1963), la mutation reverse (HURST et FOGEL, 1964) et les modèles de WHITEHOUSE (1963). Apparemment, aucun des modèles, sous sa forme originelle, ne peut rendre compte de la totalité des faits. Nous prendrons comme base le premier modèle de WHITEHOUSE, schématisé dans la figure 36, qui permet de rendre compte des notions suivantes :

1)- Il explique la relation entre conversion génique et crossing-over. La conversion, en effet,

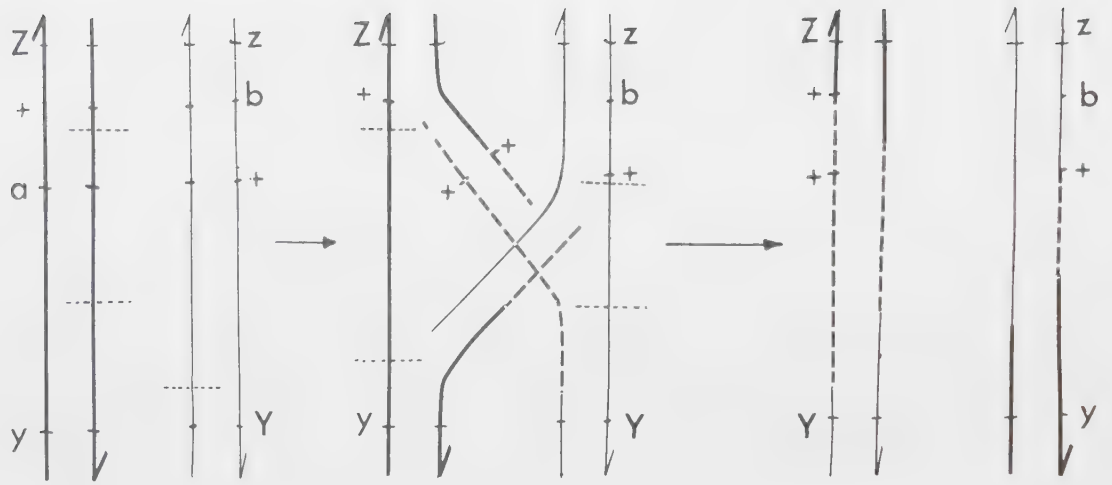


FIGURE 36

Modèle moléculaire de recombinaison proposé par WHITEHOUSE (1963)

Relation entre la recombinaison non-réciproque (conversion génique) pour les sites a et b, et la recombinaison réciproque (crossing-over) pour les sites Z et Y.

est fréquemment associée à une recombinaison réciproque des loci adjacents ; ce phénomène a été décrit aussi chez la levure (KAKAR, 1963a ; FOGEL et HURST, 1963) .

2) - Il est fondé sur l'appariement spécifique des bases entre deux brins d'ADN appartenant à deux molécules homologues.

3) - Il postule un mécanisme de rupture suivi de resoudage de l'ADN, semblable à celui proposé pour la recombinaison chez le phage. En outre, il considère comme nécessaire la synthèse d'une faible quantité d'ADN et la perte simultanée d'une quantité équivalente. Il est intéressant de remarquer que ce dernier point a été également suggéré récemment par MESELSON (1964), dans le cas de la recombinaison chez le phage.

Il est évident que nous n'avons pas l'intention ici d'apporter une solution au problème de la conversion génique. Si nous prenons comme base le modèle de WHITEHOUSE, malgré ses insuffisances, c'est que la représentation au niveau moléculaire qu'il fournit nous permet d'entrevoir un lien entre la recombinaison et la régulation.

B - Si la conversion génique a lieu selon le modèle schématisé dans la figure 36, comment l'histidine peut-elle inhiber cette fonction autocatalyptique du gène ? On peut penser qu'elle joue un rôle d'effecteur analogue à celui du co-represseur lors de la régulation de la fonction hétérocatalytique. Nous sommes donc conduits à passer en revue ce que l'on connaît de la régulation de la biosynthèse des protéines.

Bien que la plupart des progrès réalisés dans ce domaine proviennent presque exclusivement de l'étude des systèmes bactériens, rien ne s'oppose formellement à les extrapoler à des organismes eucaryotiques tels que la levure.

Les connaissances actuelles sur la synthèse des protéines et sur les mécanismes de régulation sont le fruit de recherches effectuées dans de nombreux laboratoires. Des auteurs ont fait récemment des mises au point d'ensemble, (JACOB et MONOD, 1964 ; AMES et MARTIN, 1964 ; MAAS et Mc FALL, 1964 ; STENT, 1964 ; SPIEGELMAN et HAYASHI , 1963) .

Résumons les principales notions :

1) - L'acide désoxyribonucléique (ADN) est le siège de l'information génétique. Cette substance a deux fonctions distinctes, autocatalytiques et hétérocatalytique. La première assure la transmission des caractères héréditaires d'une cellule à sa descendance, la deuxième permet la manifestation de ces caractères. Les mécanismes impliqués ne sont pas foncièrement différents : il s'agit dans les deux cas du passage d'information d'une chaîne polynucléotidique

à une autre, grâce à un appariement spécifique des bases, guanine-cytosine, adénine-thymine (ou adénine-uracile).

2) - L'acide ribonucléique (ARN) est synthétisé en utilisant comme matrice une des deux chaînes complémentaires de l'ADN. Trois types d'ADN sont ainsi formés : l'ARN ribosomal, qui associé à des protéines donne naissance aux ribosomes, siège de la synthèse protéique ; l'ARN de transfert dont les différentes espèces ont une double affinité : d'une part avec un enzyme activateur qui permet de lui attacher un acide aminé donné, d'autre part avec le troisième type d'ARN, l'ARN messager. Cette dernière affinité a également lieu grâce à l'appariement spécifique des bases. C'est l'ARN messager qui porte le code génétique de la synthèse des protéines, et le processus du passage d'information ADN vers ARN messager est connu sous le nom de transcription. L'unité de transcription est l'opéron, qui conduit à la formation d'un seul message polycistronique.

3) - La séquence des nucléotides de l'ARN messager est "traduite" en chaîne polypeptidique par l'action coopérative des ribosomes et des ARN de transfert. Ces derniers, porteurs d'acides aminés, sont capables de reconnaître une séquence de trois nucléotides adjacents de l' ARN messager. Ceci conduit à la mise en place, l'un à côté de l'autre, des différents acides aminés, permettant ainsi la synthèse de la chaîne polypeptidique. Ce processus est connu sous le nom de traduction. Le messager peut être "lu" par plusieurs ribosomes simultanément, en donnant lieu à la formation de polysomes.

4) - La régulation de la synthèse des protéines se fait par une macromolécule, le répresseur, dont la fonction peut être modifiée par des petites molécules (effecteurs). Il existe un ou des gênes de régulation généralement non liés à l'opéron, qui gouvernent la structure du répresseur. La nature chimique de celui-ci n'est pas connue, mais on pense généralement qu'il s'agit d'une protéine. Selon SLONIMSKI, ACHER, PERE, SELS et SOMLO (1963), le répresseur pourrait être une iso-chaîne polypeptidique, ayant une séquence très voisine de la protéine soumise à la régulation.

5) - Il existe aussi un site spécifique dans l'opéron, le gène opérateur, caractérisé par des mutations du type constitutif dominant (0^c). Un élément génétique nouveau a été défini récemment (JACOB, ULLMAN et MONOD, 1964) pour l' opéron lactose chez E. coli : le promoteur, qui correspond à l'initiation soit de la transcription, soit de la traduction.

C - La connaissance du niveau d'action du répresseur pose l'une des questions les plus controversées à l'heure actuelle. Il pourrait agir soit sur le gène opérateur, au niveau de l'ADN, en empêchant la transcription du messager, soit sur le messager (ARN),

au niveau de la transcription de l'opérateur, en empêchant la traduction, soit au niveau du début de la chaîne polypeptidique, en empêchant la suite de la synthèse de la protéine.

Voyons comment ces différentes notions peuvent être utilisées pour rendre compte de l'inhibition spécifique de la recombinaison intragénique.

1) - Supposons que le répresseur empêche la synthèse de la protéine par son action au niveau de la chaîne polypeptidique naissante. On peut concevoir que l'ARN messager, lorsqu'il n'est pas " lu " par les ribosomes, restera associé à l'ADN. Cette association peut conduire à l'empêchement de la recombinaison intragénique. S'il en était ainsi, le gène se recombinerait seulement lorsqu'il se trouverait en état de dérépression hétérocatalytique. Mais alors, chez la plupart des gènes, on s'attendrait à une corrélation négative entre leur fonctionnement et leur fréquence de recombinaison . Or, comme nous l'avons vu, le cas du gène ad3 est unique à l'heure actuelle.

2) - Supposons que le répresseur empêche soit la traduction, soit la transcription . Dans ces deux cas, le répresseur, quelle qu'en soit la nature, doit pouvoir reconnaître une séquence spécifique de nucléotides d'un brin d'ADN ou de l'ARN messager . Dans le modèle de WHITEHOUSE, la recombinaison fait intervenir deux brins complémentaires de l'ADN, appartenant respectivement aux deux molécules homologues. Nous pensons qu'il suffit d'une association du répresseur avec l'un des deux brins pour empêcher mécaniquement ou stériquement la recombinaison.

Si la répression agit au niveau de l'ADN, on conçoit comment un tel complexe peut se former. Si la répression de la biosynthèse de protéines se fait au niveau de l' ARN messager, le répresseur pourrait également s'associer à l'un des deux brins d'ADN. En effet, la séquence des nucléotides de l'ARN messager est complémentaire de celle du brin d'ADN qui lui a donné naissance, et est donc identique à celle de l'autre brin d'ADN .

La figure 37 schématise cette hypothèse . Si le répresseur agit au niveau de l'ADN, il s'associe, par exemple, avec une séquence ..... ACTG ..... S'il agit au niveau de l'ARN messager, il s'associera avec la séquence ..... UGAC ..... du messager et également avec la séquence ..... TGAC ..... de l'ADN .

D - Cette hypothèse permet de rendre compte de l'ensemble des résultats expérimentaux décrits dans ce mémoire.

1) - La spécificité chimique et génétique de l'inhibition par l'histidine de la conversion génique au locus ad3 s'explique aisément : seule l'histidine peut activer un apo-répresseur spécifique

et le répresseur actif ainsi formé ne peut reconnaître qu'une séquence de nucléotides bien déterminée, proche ou formant partie du locus ad3 .

2) - Que la mutation reverse soit insensible à l'histidine (CLAVILIER, 1962), ne doit pas nous étonner, car le mécanisme génétique mis en jeu pour la mutation (substitution des bases) est différent de celui de la conversion génique. Il est donc compréhensible que le répresseur ne puisse avoir d'action sur la mutation reverse. Notons par ailleurs que les données de CLAVILIER permettent de rejeter le modèle de recombinaison proposé par HURST et FOGEL (1964) .

3) - Nous avons vu qu'une certaine activité métabolique est nécessaire pour que la conversion génique ait lieu. Ceci pourrait correspondre à la faible synthèse d'ADN qui aurait lieu pendant la recombinaison selon le modèle postulé par WHITEHOUSE.

4)- L'étude de la cinétique d'action de l'histidine a montré d'une part, que la conversion génique n'est pas inhibée quand l'histidine est ajoutée 24 heures après l'étalement. D'autre part, l'histidine présente seulement pendant les premières 24 heures est suffisante pour inhiber la conversion génique, même cinq jours plus tard. L'hypothèse la plus simple est de considérer que la recombinaison ne peut avoir lieu que pendant un temps limité. Si, par contre on considère que l'évènement génétique a lieu avec une probabilité égale au cours du temps, il faudrait admettre :

- que l'aporépresseur ne peut être synthétisé que pendant un temps limité,
- que, une fois le répresseur actif formé, il est stable.

Ceci est peu probable car l'étude de la conversion génique en milieu liquide nous a permis de préciser que l'évènement génétique n'a pas lieu avant la treizième heure d'incubation en milieu minimal. Ce délai est vraisemblablement le temps nécessaire aux cellules pour épuiser l'histidine interne, les cellules se trouvant ainsi en état de dérepression. On voit mal comment le répresseur serait instable à la treizième heure et deviendrait stable à partir de la vingt-quatrième.

5) - Le locus ad3 doit comporter une séquence de nucléotides sensible au répresseur. Une telle séquence est la définition même d'un gêne opérateur, (voir discussion Ch. IV) . D'un autre côté, ad3 est sensible à des suppresseurs rendant la souche bradytrope pour l'histidine . L'existence de ces mero-suppresseurs, qui ressemblent à certains suppresseurs de l'opéron lactose chez E. coli (BECKWITH, 1964a), peut indiquer que ad3 est un mutant de type polaire extrême. Par ailleurs, nous avons proposé (discussion Ch. III) un modèle pour expliquer l'inhibition de la conversion génique par les mero-suppresseurs externes au locus ad3,

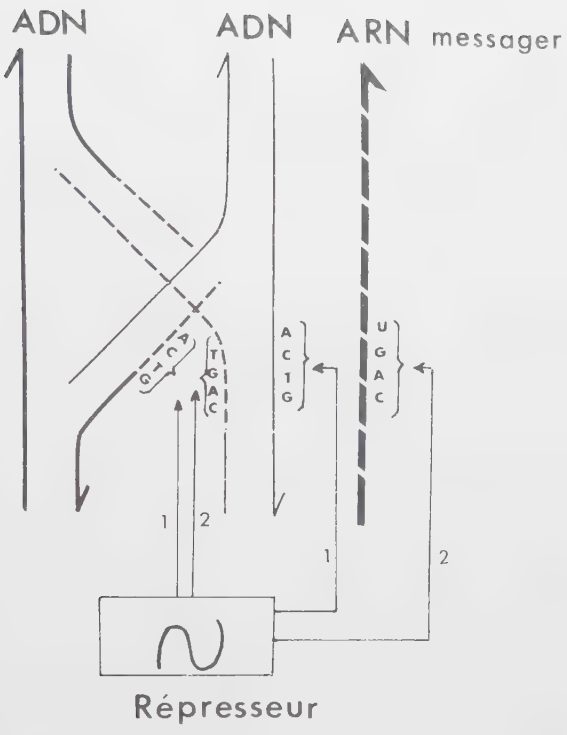


FIGURE 37

Schéma rendant compte de l'action du répresseur sur la recombinaison :

1) le répresseur agit au niveau de la transcription,

2) le répresseur agit au niveau de la traduction .

qui est basé sur le même principe d'appariement spécifique des bases que l'hypothèse que nous avons émise plus haut.

Nous définirons finalement ad3 comme un mutant de type opérateur : il aurait certaines propriétés des 0^{c+} (sensibilité au répresseur), d'autres des 0^{o} (pléiotropie et sensibilité aux suppresseurs), sans toutefois posséder l'ensemble des caractéristiques de l'une ou de l'autre de ces mutations.

6) - Si le répresseur n'agit que sur des gènes de type opérateur la conversion génique d'un gène de structure ne devrait pas être affectée par le produit final de la chaîne de biosynthèse. Nous avons étudié la conversion génique de trois gènes de structure, th2 (CLAVILIER, 1962), th3 et th6 qui correspondent à l'absence respective de la semi-aldehyde aspartique deshydrogénase, l'aspartokinase et de l'homosérine deshydrogénase (de ROBICHON-SZULMAJSTER, dans VON BORSTEL, 1964). Ces mutations conduisent à l'exigence simultanée en méthionine et en thréonine et aucun de ces deux acides aminés n'inhibe la conversion génique de ces trois gènes.

La répression de la biosynthèse des protéines rendrait compte de l'inhibition par l'histidine de la conversion génique au locus ad3. Quelles expériences pourrait-on envisager pour mettre à l'épreuve notre hypothèse ?

Un premier type d'expérience serait l'étude de la conversion génique chez des souches déréprimées pour la chaîne de l'histidine. Une souche déréprimée est une souche qui, à la suite d'une mutation a perdu la capacité de former l'apo-répresseur. La conversion génique d'une souche diploïde hétéroallélique pour ad3 et homozygote pour le gène de régulation (à l'état muté), ne devrait pas être inhibée par l'histidine. La technique couramment employée pour isoler de tels mutants est la sélection des souches résistantes à un analogue structural du métabolite nécessaire à la croissance . Pour la chaîne de biosynthèse de l'histidine, l'analogue qui a été utilisé avec succès pour isoler des mutants déréprimés chez Salmonella, est la triazole alanine (AMES et HARTMAN, 1963) . La faible quantité dont nous disposions ne nous a pas permis de l'utiliser comme agent sélectif pour isoler de tels mutants. D'autres essais pour l'obtention de souches déréprimées pour la chaîne de l'histidine n'ont pas été couronnés de succès.

Nous pourrions ensuite faire une analyse poussée aussi bien génétique que biochimique qui devrait permettre de démontrer que le gène ad3 est une mutation de type opérateur. Par exemple la connaissance de la structure fine du locus ad3 serait précieuse. Ainsi nous saurions si les quatre hétéroallalèles dont les combinaisons sont sensibles à l'histidine (CLAVILIER, LUZZATI et SLONIMSKI, 1960), sont situés à une extrémité du

locus ad3, ou si n'importe quelle combinaison hétéroallélique à l'intérieur d'ad3 est sensible à l'histidine.

Enfin, il devrait être possible de généraliser ce genre de répression spécifique de la recombinaison chez d'autres gènes de type opérateur. Chez la levure, le mutant hi4ABC, se comporte soit comme un mutant opérateur, soit comme un mutant polaire extrême (FINK, 1964). On devrait s'attendre à ce que chez une souche diploïde hétéroallélique pour hi4ABC, la cinétique de la conversion génique soit semblable à celle des souches ad3 : une période de latence pendant laquelle les cellules épuisent l'histidine, et une fois l'état de dérépression atteint, la conversion génique aurait lieu.

Il serait très intéressant d'étudier si la recombinaison est sensible à ce mécanisme de régulation chez les bactéries où les gènes opérateurs sont mieux connus. Par exemple, pour l'opéron lactose chez E. coli, la fréquence de recombinaison entre deux mutants 0^o pourrait être différente en présence ou absence d'inducteur. La même différence devrait exister entre des souches inductibles (i^+) et des souches constitutives (i^-). Les suppresseurs des mutants 0^o de l'opéron lactose pourraient également inhiber la recombinaison entre deux mutants 0^o.

En conclusion, les résultats présentés suggèrent qu'une fonction autocatalytique du gène est soumise à un système de régulation analogue à celui qui agit sur les fonctions hétérocatalytiques des gènes.

Si on peut étendre une telle observation à d'autres systèmes biologiques, on sera en mesure d'envisager l'étude des problèmes de régulation au niveau chromosomique sous un angle nouveau.

RESUME

La recombinaison étudiée est une recombinaison mitotique non réciproque entre deux allèles. Il s'agit d'un cas de conversion génique. Elle est décelée par l'apparition de colonies prototrophes à partir d'une population de cellules diploïdes hétéroalléliques auxotrophes.

La recombinaison intragénique au locus ad3 chez la levure Saccaromyces cerevisiae est inhibée spécifiquement par la L-histidine. Le gène ad3 gouverne les besoins simultanés en adenine et histidine. Cette étude constitue le premier exemple d'inhibition d'un évènement génétique par le produit final de la chaîne biosynthétique qu'il gouverne. Cette inhibition a une spécificité chimique très poussée. Aucune des substances essayées, que ce soit parmi les métabolites naturels ou parmi les analogues structuraux, n'a d'action directe sur la conversion génique. La D-histidine a un comportement particulier : elle n'a pas d'action inhibitrice et au contraire, est capable de lever l'inhibition provoquée par la L-histidine. A cette spécificité chimique s'ajoute une remarquable spécificité génétique, qui est connue par ailleurs : la conversion génique au locus th2 n'est pas inhibée par l'histidine, et cet acide aminé n'a aucune action sur la mutation reverse ni du diploïde homoallélique , ni de l'haploïde ad3 .

L'étude cinétique de l'inhibition par l'histidine a montré que l'évènement génétique n'a pas lieu avec une probabilité égale au cours du temps, lors de l'étalement d'une souche diploïde hétéroallélique sur du milieu minimal. La conversion génique a lieu entre la huitième et la vingtquatrième heure, et elle s'exprime avec un délai de plusieurs jours. Ce fait, ainsi que l'action particulière de l'acriflavine sur la levure, a permis de mettre au point une technique en milieu liquide. Grâce à elle, l'inhibition par l'histidine de la recombinaison intragénique au locus ad3 a pu être démontrée sans ambiguités : toute explication basée sur un mécanisme d'action autre que l'inhibition de l'évènement génétique lui-même a été éliminée.

Au cours de la recherche de reversions du gène ad3 , des gènes suppresseurs d'un type particulier ont été mis en évidence. Leur caractéristique est de rendre les souches ad3 auxotrophes pour l'adenine et bradytrophes pour l'histidine. Ils ont été appelés mero-suppresseurs ; ils restaurent une partie du phénotype gouverné par un gène pleiotrope. Ces mero-suppresseurs se classent en trois catégories au moins :

1) Mero-suppresseurs récessifs non liés à ad3
2) Mero-suppresseurs dominants non liés à ad3
3) Mero-suppresseurs dominants "intragéniques".

Un fait remarquable est l'action de ces mero-suppresseurs sur la conver-

sion génique au locus ad3 : les mero-suppresseurs externes inhibent la recombinaison à ce locus, tandis qu'un mero-suppresseur "intragénique" ne le fait pas. Il s'agit donc d'un cas de la suppression de la recombinaison intragénique d'un gène par des gènes non liés à celui-ci. Une hypothèse concernant le mécanisme de cette inhibition est proposée.

A la suite de l'étude de quelques aspects de la biosynthèse de l'adénine et de l'histidine chez la levure, il a été montré que cette biosynthèse ne diffère pas de celle des autres organismes. Par ailleurs l'étude de la régulation de la voie biosynthétique de l'histidine, a montré que les niveaux de deux enzymes, l'histidinol-phosphate phosphatase et l'histidinol deshydrogénase, sont toujours relativement bas chez une souche sauvage, qu'elle soit cultivée en présence ou en absence d'histidine. Ceci implique que la souche se trouve en état de répression pour ces deux enzymes. Il est possible d'obtenir une augmentation du niveau de base pour la deshydrogénase, mais pas pour la phosphatase, si on carence en histidine des souches exigeant cet acide aminé. Cette étude a permis, en outre, de préciser que les loci hi2 et hi9 correspondent à l'absence de phosphatase et deshydrogénase respectivement.

Quelques hypothèses concernant le point de coupure de la chaîne métabolique correspondant à la mutation ad3 sont discutées, ainsi qu'une hypothèse concernant le mécanisme de l'inhibition spécifique par l'histidine de la recombinaison intragénique au locus ad3 .

En conclusion, les résultats présentés suggèrent qu'une fonction autocatalytique du gène, la recombinaison, est soumise à un système de régulation par des métabolites spécifiques au même titre que les fonctions hétérocatalytiques des gènes.

BIBLIOGRAPHIE

AMES B.N. (1956) The biosynthesis of histidine ; L-histidine phosphate phosphatase. J. Biol. Chem., 226, 583-593.

AMES B.N. et GARRY B. (1959) Coordinate repression of the synthesis of four histidine biosynthetic enzymes by histidine. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. 45, 1453-1461.

AMES B.N. et HARTMAN P.E. (1962) Genes, enzymes and control mechanisms in histidine biosynthesis. The Molecular Basis of Neoplasia. The University of Texas Press, Austin, 322-345.

AMES B.N. HARTMAN P.E. et JACOB F. (1963) Chromosomal alterations affecting the regulation of histidine biosynthetic enzymes in Salmonella. J. Mol. Biol., 7 , 23-42

AMES B.N. et MARTIN R.G. (1964) Biochemical aspects of genetics : the operon. Ann. Rev. Biochem., 33, 235-258.

AMES B.N., MARTIN R.G. et GARRY B.J. (1961) The first step of histidine biosynthesis J. Biol. Chem. 236, 2019-2026 .

BECKWITH J.R. (1963) Restoration of operon activity by suppressors. Biochim. Biophys. Acta. 76, 162-164 .

BECKWITH J.R. (1964a) Restoration of operon activity by suppressor, in Structure and Function of the Genetic Material, 119-124. Abh. Deutsche Ak. Wissenschaften Berlin : Akademic-Verlag.

BECKWITH J.R. (1964b) A deletion analysis of the lac operator region in E. coli. J. Mol. Biol. , 8 , 427-430.

BENNETT J.C. & DREYER W.J. (1964) Genetic coding for protein structure. Ann. Rev. Biochem., 33, 205-234.

BENZER S. et CHAMPE S.P. (1962) A change from nonsense to sense in the genetic code. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S., 48, 1114-1121.

BRATTON A.C., et MARSHALL E.K. (1939) A new coupling component for sulfanilamide determination, J. Biol.Chem., 128, 537-550.

BUCHANAN J.M. et HARTMAN S.C. (1959) Enzymic reactions in the synthesis of the purines. Advan. Enzymol. 21, 199-261.

BURNS V.W. (1964) Regulation and coordination of purine and pyrimidine biosynthesis in yeast. I. Regulation of purine biosynthesis and its relation to transient changes in intracellular nucleotide levels. Biophys. J., 4, 151-166.

CLAVILIER L.(1962) Recherches sur la spécificité génétique de l'inhibition par l'histidine des reversions chez la levure Saccharomyces cerevisiae. Thèse de 3ème Cycle, Faculté des Sciences de Paris.

CLAVILIER L. LUZZATI M. et SLONIMSKI P.P. (1960) Sur la conversion du gène ad3 chez la levure. Compt. Rend. Soc. Biol., 154, 1970-1974.

COUGHLIN C.A. et ADELBERG E.A. (1956) Bacterial mutation induced by thymine starvation. Nature, 178, 531-532.

CRICK F.H.C., BARNETT L., BRENNER S. et WATTS-TOBIN R.J. (1961) General nature of the genetic code for proteins. Nature, 192, 1227-1232.

DAVIS R.H. et WOODWARD V.W. (1962) The relationship between gene suppression and aspartate transcarbamylase activity in pyr-3 mutants of Neurospora. Genetics, 47 1075-1083.

DORFMAN B. (1963) Intragenic complementation and precursor accumulation at several loci controlling adenine biosynthesis in yeast (Abst.) Genetics, 48, 887 .

DOUGLAS H.C. et HAWTHORNE D.C. (1964) Enzymatic expression and genetic linkage of genes controlling galactose utilization in Saccharomyces. Genetics, 49, 837-844 .

EPHRUSSI B. HOTTINGUER H. et CHIMENES A.M. (1949) . Action de l'acriflavine sur les levures. I. La mutation "petite colonie". Ann. Inst. Pasteur, 76, 351-368 .

EPHRUSSI B., HOTTINGUER H. et TAVLITZKI S. (1949b) Action de l'acriflavine sur les levures. II. Etude génétique du mutant "petite colonie". Ann.Inst. Pasteur, 76 , 419-450 .

EPHRUSSI B. et HOTTINGUER H. (1951) Cytoplasmic constituents of heredity. On an unstable cell state in yeast. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 16, 75-85.

FINK G.R. (1964) Gene-enzyme relations in histidine biosynthesis in yeast. Science, 146, 525-526 .

FOGEL S. et HURST D.D. (1963) Coincidence relations between gene conversion and mitotic recombination in Saccharomyces. Genetics, 48, 321-328 .

FREESE E. (1957) The correlation effect for a histidine locus of Neurospora crassa . Genetics, 42, 671-684 .

GALZY P. et SLONIMSKI P.P. (1957) Variations physiologiques de la levure au cours de la croissance sur l'acide lactique ou sur glucose comme seule source de carbone. Comptes rendus, 245, 2423.

GAREN A. et SIDDIQI O. (1962). Suppression of mutations in the alkaline phosphatase structural cistron of E. coli. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S., 48, 1121-1127 .

GILES N.H. (1958) Mutation at specific loci in Neurospora. Proc. X. Int. Cong. Genetics, I, 261-279 .

GORINI L. (1958) Regulation en retour (feedback control) de la synthèse de l'arginine chez Escherichia coli. Bull. Soc. Chim. Biol., 40, 1939-1952 .

GOTS J.S. et GOLLUB E.G. (1957) Sequential blockade in adenine biosynthesis by genetic loss of an apparent bifonctional deacylase. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. 43, 826-834.

GRIGG G.W. (1952) Back mutation assay method in microorganisms. Nature. 169, 98-100

HARTMAN P.E., LOPER J.C. et SERMAN D. (1960) Fine structure mapping by complete transduction between histidine-requiring Salmonella mutants. J. Gen. Microbiol., 22, 323-353.

HAWTHORNE D.C. et MORTIMER R.K. (1963) Super-suppressor in yeast. Genetics, 48, 617-620.

HELINSKI D.R. et YANOFSKY C. (1963) A genetic and biochemical analysis of second site reversion. J. Biol. Chem., 238, 1043-1048 .

HENNING U. et YANOFSKY C. (1962) Amino acid replacement associated with reversion and recombination within the A. gene. Proc. Nat. Acad. Sci., U.S., 48, 1497-1504.

HURST D.D. et FOGEL S. (1964) Mitotic recombination and heteroallelic repair in Saccharomyces cerevisiae . Genetics, 50, 435-458 .

JACOB F. et MONOD J. (1961a) On the regulation of gene activity. Cold Spring Harbor. Symp. Quant. Biol. , 26, 193-211.

JACOB F. et MONOD J. (1961b) Genetic regulatory mechanisms in the synthesis of proteins. J. Mol. Biol., 3, 318-356 .

JACOB F. et MONOD J. (1964) Mecanismes biochimiques et génétiques de la régulation dans la cellule bactérienne. Bull. Soc. Chim. Biol. 46, 1499-1532.

JACOB F., ULLMAN A. et MONOD J. (1964) Le promoteur, élément génétique nécessaire à l'expression d'un opéron. Comptes rendus, 258, 3125-3128.

JOHNSTON J.R. et MORTIMER R.K. (1959) Use of snail digestive juice in isolation of yeast spore tetrads. J. Bacteriol., 78, 292

KAKAR S.N. (1963a) Allelic recombination and its relation to recombination of outside markers in yeast. Genetics, 48, 957-966.

KAKAR S.N. (1963) Suppressor mutations for the isoleucine locus in Saccharomyces. Genetics, 48, 967-969.

KAKAR S.N., ZIMMERMANN F. et WAGNER R.A. (1964) Reversion behaviour of iso-val mutants in yeast. Mutation Res., 1, 381-386

KALCKAR H.M. (1947) The enzymatic synthesis of purine ribosides. J. Biol. Chem., 167, 477-486 .

KLOPOTOWSKI T., LUZZATI M. et SLONIMSKI P.P. (1960) Evidence for a new step between ATP and 5-amino 4-imidazole carboxamide ribotide in the cycle process of histidine biosynthesis. Biochem. Biophys. Res . Commun., 3, 150-154.

LEDERBERG J. (1955) Recombination mechanims in bacteria. J. Cell. Comp. Physiol., 45, (suppl. 2),75.

LESTER G. et YANOFSKY C. (1961) Influence of 3-methylanthranilic and anthranilic acids on the formation of tryptophan synthetase in E. coli . J. Bacteriol., 8I, 81-90.

LISSOUBA P., MOUSSEAU J., RIZET G. et ROSSIGNOL J.C. (1962) Fine structure of genes in the ascomycete Ascobolus immersus. Advan. Genet. 11, 343-380.

LOVE S.H. et BOYLES P.D. (1959) Studies on the synthesis of 5-amino 4-imidazole carboxamide ribotide by cell-free extracts of E. coli. Biochim. Biophys. Acta., 35, 374-380.

LUZZATI M., CLAVILIER L. et SLONIMSKI P.P. (1959) Inhibition par l'histidine de la reversion prototrophe chez la levure diploïde hétéroallélique pour le locus adenine-histidine. Comptes rendus, 249, 1412-1414 .

MASS W.K. et Mc FALL E. (1964) Genetic aspects of metabolic control. Ann. Rev. Microbiol., 18, 95-110 .

MAC CLARY D.O., NULTY W.L. et MILLER G.R. (1959) Effect of potassium versus sodium in the spolulation of Saccharomyces. J. Bacteriol. , 78, 362-368

MAGASANIK B. et KARIBIAN D. (1960) Purine nucleotide cycles and their metabolic role. J. Biol. Chem., 235, 2672-2681.

MARCOVICH H. (1953) Influence du pH sur l'action toxique et mutagène de l'euflavine sur la levure. Ann. Inst. Pasteur, 85, 443-450

MARTIN R.G. (1962) The first enzyme in histidine biosynthesis. The nature of feedback inhibition by histidine. J. Biol. Chem., 238, 257-268.

MESELSON M. (1964) On the mechanism of genetic recombination between DNA molecules. J. Mol. Biol., 9, 734-745 .

MONOD J. et COHN M. (1952) La biosynthèse induite des enzymes (adaptation enzymatique) Advan. Enzymol., 13, 67-119.

MONOD J. et JACOB F. (1961) Teleonomic mechanisms in cellular metabolism, growth and differentiation. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 26, 389-401.

MOYED H.S. et FRIEDMAN M. (1959) Interference with feedback control : a mechanism of antimetabolite action. Science, 129, 968-969.

MOYED H.S. et MAGASANIK B. (1960) The biosynthesis of the imidazole ring of histidine. J. Biol. Chem. 235, 149-153 .

PARKS L.W. et DOUGLAS H.C. (1957) A genetic and biochemical analysis of mutants to tryptophan independence in Saccharomyces. Genetics, 42, 283-288.

PORATH J. (1960) Gel filtration of proteins, peptides and amino acids. Biochim. Biophys. Acta, 39, 193-207.

PREVOST G. (1962) Etude génétique d'un basidiomycète : "Coprinus radiatus" Fr. ex Bolt. Ann. Sci. Nat. Botan., 12ème S.T. III, 428-613.

PRITCHARD R.H. (1960) Localized negative interference and its bearing on models of gene recombination. Genet. Res. , 1, 1-24.

REAUME S.E. et TATUM E.L. (1949) Spontaneous and nitrogen mustard induced nutritional deficiencies in Saccharomyces cerevisiae. Arch. Biochem. 22, 331-338.

RICHMOND M.H. (1962) The effects of amino acid analogues on growth and protein synthesis in microorganisms. Bacteriol. Rev. 26, 398-420.

ROMAN H. (1956a) Studies of gene mutation in Saccharomyces. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 21, 175-185.

ROMAN H. (1956b) A system selective for mutations affecting the synthesis of adenine in yeast. Compt. Rend. Lab. Carlsberg, Ser. Physiol., 26, 299-314.

ROMAN H. (1963) Genic conversion in fungi. Methodology in Basic Genetics, 209-227. Edited by W.J. Burdette, Holden-Day, San Francisco.

SHEDLOVSKY A. et MAGASANIK B. (1962a) A defect in histidine biosynthesis causing an adenine deficiency. J. Biol. Chem., 237, 3725-3730

SHEDLOVSKY A. et MAGASANIK B. (1962b) The enzymatic basis of an adenine-histidine relationship in E. coli . J. Biol. Chem., 237, 3731-3736.

SHERMAN F. et SLONIMSKI P.P. (1964) Respiration-deficient mutants of yeast. II. Biochemistry. Biochim. Biophys. Acta, 90, 1-15

SLONIMSKI P.P. (1949) Action de l'acriflavine sur les levures. IV. Mode d'utilisation du glucose par les mutants "petite colonie". Ann. Inst. Pasteur, 76, 510-531.

SLONIMSKI P.P. (1953) Formation des enzymes respiratoires chez la levure. Masson, Paris.

SLONIMSKI P.P., ACHER R., PERE G., SELS A. et SOMLO M. (1963) Elements du système respiratoire et leur regulation : cytochromes et iso-cytochromes. Colloque du CNRS, Marseille, Mecanismes de regulation ... p. 435-461.

SMITH D.W.E. et AMES B.N. (1964) Intermediate in the early steps of histidine biosynthesis. J. Biol. Chem., 239, 1848-1855.

SOMLO M. (1965) Induction des lactico-cytochrome c réductase (D- et L-) de la levure aérobie par les lactates (D- et L-). Biochim. Biophys. Acta, 97, 183-201.

SPIEGELMAN S. et HAYASHI M. (1963) The present status of the transfer of genetic information and its control. Cold. Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 28, 161-182.

STADLER D.R. et TOWE A.M. (1963) Recombination of allelic cysteine mutants in Neurospora. Genetics, 48, 1323-1344.

STENT G.S. (1964) The operon : on its third anniversary. Science, 144, 816-820.

SUMNER J.B. (1944) A method for the colorimetric determination of phosphorus. Science, 100, 413-414.

TAVLITZKI J. (1949) Action de l'acriflavine sur les levures. III. Etude de la croissance des mutants "petite colonie". Ann. Inst. Pasteur, 76, 497-510.

TAVLITZKI J. (1951) Sur les conditions de la formation de pigment chez une levure rouge. Rev. Can. Biol., 10, 48-59.

UMBARGER H.E. (1961) Feedback control by end product inhibition. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 26, 301-312

VON BORSTEL R.C. (1963) Carbondale Yeast Genetics Conference. Microbiol. Genet. Bull., 19, (supp).

VON BORSTEL R.C. (1964) Gif-sur-Yvette Yeast Genetics Conference. Microbiol. Genet. Bull., 20, (supp).

WHITEHOUSE H.L.K. (1963) A theory of crossing over by means of hybrid deoxyribonucleic acid. Nature, 199, 1034-1040.

WOODWARD J.D. et RAINBOW C. (1961) 5-aminoimidazole and its riboside from biotin-deficient yeast. J. Gen. Microb., 25, 141-149.

WYNGAARDEN J.B. et ASHTON D.M. (1959) The regulation of activity of phosphoribosyl pyrophosphate amidotransferase by purine ribonucleotides : a potential feedback control of purine biosynthesis . J. Biol. Chem., 234, 1492-1496.

YANOFSKY C., HELINSKI D.R. et MALING B.D. (1961) The effect of mutation on the composition and properties of the A protein in E. coli tryptophan synthetase. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 26, 11-24.

INHIBITION SPECIFIQUE DE LA RECOMBINAISON INTRAGENIQUE

TABLE DES MATIERES

	Pages
INTRODUCTION	1
CHAPITRE I - MATERIEL, DEFINITION et TECHNIQUES	5
I. INTRODUCTION	5
II. NOMENCLATURE	6
III. MATERIEL	7
A. Souches haploides provenant d'autres laboratoires	7
B. Souches haploides isolées au laboratoire,	8
C. Souches diploides.	8
IV. COMPOSITION DES MILIEUX DE CULTURE	9
A. Milieux naturels	9
B. Milieux synthétiques	9
C. Milieu de presporulation	9
D. Milieu de sporulation	10
V. DEFINITIONS	10
VI. TECHNIQUES	11
A. Stérilisations	11
B. Collections	11
C. Modes de culture	11
1. Cultures liquides	11
2. Cultures sur milieux solides	11
D. Mesure de la croissance	11
E. Techniques génétiques	12
1. Obtention des diploides	12
2. Sporulation	12
3. Dissection d'asques	12
4. Analyse des tétrades	13
5. Test fonctionnel d'allélisme	14
6. Test d'hétéroallélisme	14
F. Techniques particulières	14
1. Addition des substances aux boîtes de Pétri par aspersion	14
2. Purification de l'agar par précipitation à l'isopropanol,	14
3. Mutagénèse par les rayons ultraviolets	15

CHAPITRE II - INHIBITION DE LA CONVERSION GENIQUE AU LOCUS ad3 PAR L'HISTIDINE 17

I. INTRODUCTION 17
II. ETUDE PHYSIOLOGIQUE DES SOUCHES ad3 17

A. Rendement de croissance en fonction des concentrations d'adénine et d'histidine 19
B. Taux de croissance 19

III. ETUDE DE L'INHIBITION DE LA CONVERSION GENIQUE PAR L'HISTIDINE 21

A. Mise en évidence 21
B. Spécificité chimique 28
C. Spécificité génétique 28
D. Cinétique 30
E. Démonstration 35

1. Principe de la technique 35
2. Détermination des conditions optimales de l'action de l'acriflavine 37

a) pH 37
b) Nombre de cellules 38
c) Concentration d'acriflavine 38
d) Effet toxique ou mutagène de l'acriflavine sur la cellule mère 38

3. Etude de la conversion génique en milieu liquide 42
4. Action d'analogues structuraux d'acides aminés sur la conversion génique. 50

IV. DISCUSSION 55
V. CONCLUSION 57

CHAPITRE III - ETUDE DE GENES SUPPRESSEURS DU GENE ad3 59

I. INTRODUCTION 59
II. PREMIERE PARTIE : CARACTERISATION 60

A. Milieux utilisés. 60
B. Isolement des mutants 60
C. Génétique des mutants isolés 63
D. Détermination de l'allélisme des suppresseurs 67
E. Conclusions de la première partie 69

III - DEUXIEME PARTIE : ACTION DES GENES SUPPRESSEURS SUR LA CONVERSION GENIQUE . 73

A. Inhibition de la conversion génique par des gènes suppresseurs 73
B. Conclusions et discussion de la première partie 76

CHAPITRE IV - QUELQUES ASPECTS DE LA BIOSYNTHESE ET DE LA REGULATION DE LA BIOSYNTHESE DE L'ADENINE ET DE L'HISTIDINE CHEZ LA LEVURE . 79

I. INTRODUCTION 79
II. ETAT ACTUEL DE NOS CONNAISSANCES SUR CE SUJET CHEZ D'AUTRES ORGANISMES. 79

III. DONNEES BIOCHIMIQUES CHEZ LA LEVURE 83
IV. PREMIERE PARTIE : ETUDE DE LA PARTIE CYCLIQUE DE BIOSYNTHESE DE L'HISTIDINE CHEZ LA LEVURE 85

A. Introduction 85
B. Matériel et méthodes 86

1. Produits chimiques 86
2. Souches 86
3. Cultures 86
4. Broyage 86
5. Obtention de l'extrait 86
6. Détermination de l'activité enzymatique 87

C. Résultats et discussions 87

1. Formation d'arylamines 87
2. Omissions et facteurs limitants 87
3. Inhibiteurs 91

a) Bases nucléiques et substances analogues 91
b) histidine et substances analogues 91

4. Acquisition de la résistance à l'inhibition par l'histidine 93

V. DEUXIEME PARTIE : ETUDE DE LA REPRESSION DE LA BIOSYNTHESE DE L'HISTIDINOL-PHOSPHATE PHOSPHATASE ET DE L'HISTIDINOL DESHYDROGENASE CHEZ LA LEVURE 95

A. Introduction 95
B. Matériel et méthodes 95

1. Produits chimiques 96
2. Souches 96
3. Cultures 96
4. Broyage 96
5. Obtention de l'extrait 96
6. Détermination de l'activité enzymatique 97

a) Phosphatase 97
b) Deshydrogenase 97

C. Résultats 100
D. Conclusions 104

VI. DISCUSSION 106

DISCUSSION GENERALE . 113

DEUXIEME THESE

PROPOSITIONS DONNEES PAR LA FACULTE

Existe-t-il une correlation entre la conversion génique et le crossing-over (chez les ascomycetes) ?

Vu et approuvé :

Paris, le 27 Avril 1965
Le Doyen de la Faculté des Sciences,

Marc ZAMANSKY

Vu
et Permis d'imprimer :
Le Recteur de l'Académie de Paris,

Jean ROCHE